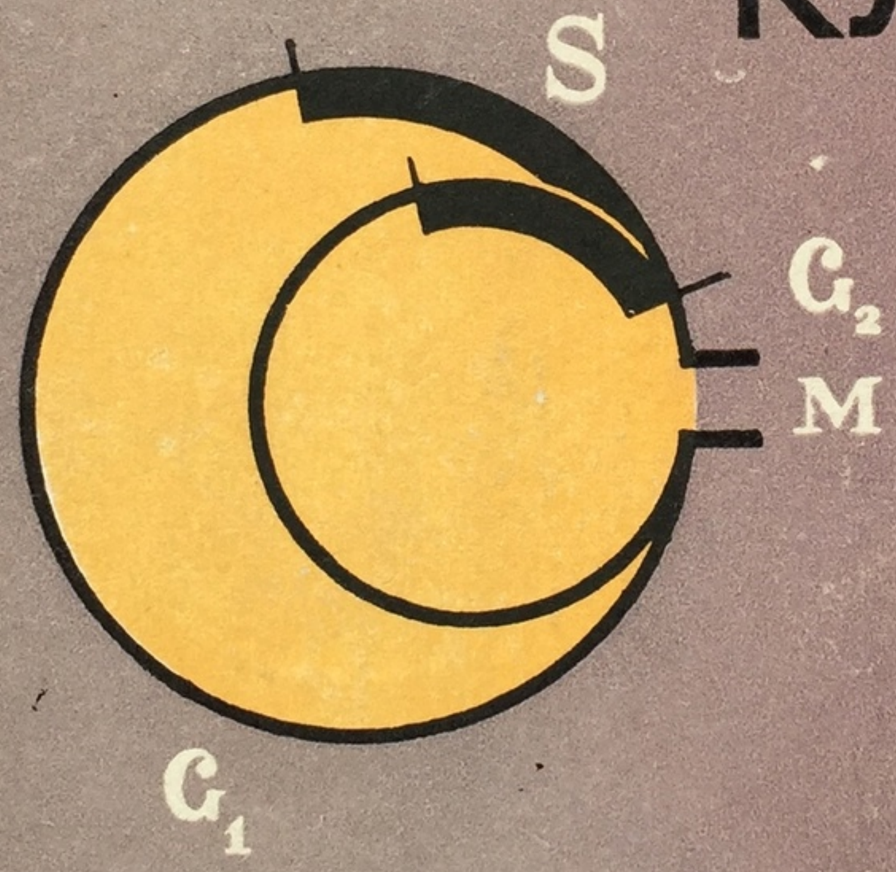
О. И. ЕПИФАНОВА

ГОРМОНЫ и РАЗМНОЖЕНИЕ КЛЕТОК



2-я ТИПОГРАФИЯ
Издательства «Наука»
Москва, Г-99, Шубинский пер., д. 10

При обнаружении недостатков
просим возвратить книгу вместе с этим
ярлыком для обмена

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

О. И. ЕПИФАНОВА

ГОРМОНЫ И РАЗМНОЖЕНИЕ КЛЕТОК

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
Москва 1965

УДК 577.17+612.018

Ответственный редактор
А. А. ПРОКОФЬЕВА-БЕЛЬГОВСКАЯ

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

Глава I.
РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ 6

1. Биологический смысл деления клеток. Митоз и его особенности 6
2. О регулировании в живых системах 15
3. Регуляция деления клеток. Понятие о митотическом режиме организма 24

Глава II.
РЕГУЛЯЦИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА 28

1. Представление о митотическом цикле и его периодах . . . 28
2. Общие закономерности прохождения клетками периодов митотического цикла 30
3. Изменения в митотических циклах при различных воздействиях. Образование блоков 34
4. Критические периоды митотического цикла 37
5. Молекулярный контроль событий митотического цикла . . . 41
6. Общие принципы регуляции жизненного цикла клетки . . . 45

Глава III.
НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА, СВЯЗАННЫЕ С ДЕЙСТВИЕМ ГОРМОНОВ 53

1. Суточная периодичность клеточного размножения 53
2. Митотический режим в условиях адаптационного синдрома . . 66

Глава IV.
ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК 79

1. Общие принципы гормональной регуляции деления клеток в организме 79
2. Представления о путях воздействия гормонов на митоз . . . 81
3. Вопрос о специфичности реакции на гормон. Органы-мишени, ткани-мишени 85

Глава V.
РОЛЬ ЭСТРОГЕНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК 87

1. Особенности действия эстрогенов на деление клеток в различных тканях 87
2. Действие эстрогенов на деление клеток в органах-мишенях . 90
3. Действие эстрогенов на деление клеток в органах, не относящихся к категории органов-мишеней 96
4. Действие эстрогенов на деление клеток в условиях инкубации органов 97
5. Вопрос об антимитотическом действии эстрогенов 100

Глава VI.
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭСТРОГЕНОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ 104
1. Действие эстрогенов на проницаемость клетки 104
2. Взаимодействие эстрогенов с ферментативными системами . 106
3. Действие эстрогенов на генетический аппарат клетки . . . 114
4. Вопрос о множественном характере действия эстрогенов на клетку 122

Глава VII.
ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА ТКАНЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ 126
1. Материал и методы исследования 126
2. Митотический режим эпителия матки и эпителия роговицы на протяжении эстрального цикла 130
3. Митотический режим эпителия матки в условиях нарушения эстральных циклов 137
4. Митотический режим эпителия матки на ранних сроках беременности 143
5. Действие эстрогенов на митотическую активность эпителия матки и эпителия роговицы 146
6. Митотический режим эпителия матки в различных условиях введения эстрогенов 149
7. Митотический режим эпителия матки при введении эстрогенов в сочетании с некоторыми метаболитами и стимуляторами деления клеток 157
8. Действие эстрогенов на продолжительность митоза и интеркинеза в эпителии матки и эпителии роговицы 163
9. Действие эстрогенов на деление клеток в эпителии матки и эпителии роговицы в условиях инкубации 169

Глава VIII.
ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ И КИНЕТИКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ 173
1. Материал и методы исследования 173
2. Действие эстрогенов на митотический цикл и кинетику клеточной популяции эпителия матки 180
3. Действие эстрогенов на митотический цикл эпителия роговицы 190
4. Радиоавтографический анализ тормозящего действия повторных инъекций эстрогена на митотический цикл эпителия матки . 193
5. Особенности реакции на эстроген ткани-мишени и неспецифической ткани 198

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 202

ЛИТЕРАТУРА 210

Посвящается памяти
Михаила Михайловича Завадовского —
выдающегося биолога, автора теории
обратных связей между органами

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнано, что основным способом размножения клеток в организме служит митоз, обеспечивающий равномерное распределение между дочерними клетками наследственного материала, заключенного в ядре. Количество клеток, вступающих в единицу времени в митоз, определяет митотическую активность ткани, ее митотический режим. Поскольку в сформированном организме митоз длится сравнительно короткое время, митотический режим ткани зависит от особенностей прохождения клетками митотического цикла, включающего наряду с митозом и весь период подготовки к делению. Таким образом, можно регулировать уровень митотического деления клеток, оказывая влияние на прохождение клетками отдельных периодов митотического цикла.

Экспериментальные и клинические данные последних лет указывают на возможность регуляции митотического цикла и управления митотическим режимом отдельных органов путем воздействия на целый организм. Среди многочисленных факторов, регулирующих размножение клеток в организме, важная роль принадлежит системе гормонов. Изменяя гормональный баланс и вызывая сдвиги в метаболизме органа, можно снижать или повышать уровень его митотической активности. Нарушение гормонального баланса неблагоприятно отражается на функционировании отдельных органов и вызывает сдвиги в митотическом режиме организма, нередко приводящие к тяжелым последствиям. Достаточно указать на такой факт, как возникновение очагов злокачественного роста при расстройстве обмена стероидных гормонов.

Вопрос о путях воздействия гормонов на митотическое деление до сих пор является дискуссионным, и ряд принципиальных положений все еще не находит объяснения. Причина этого кроется, с одной стороны, во множественном характере влияния

гормонов на клетки, затрудняющем анализ их действия, а с другой стороны, в большой разобщенности основных направлений исследований проблемы гормональной регуляции деления клеток — биохимического и цитологического.

Поскольку центральным вопросом рассматриваемой области является вопрос о специфичности реакции органа (ткани) на гормон, усилия исследователей сосредоточились главным образом на попытках обнаружить критическую ключевую реакцию, ответственную за весь комплекс изменений, вызываемых гормонами в определенных органах — так называемых органах-мишенях. Это повлекло за собой большое количество работ по изучению первичного действия гормонов на реакции внутриклеточного метаболизма органов-мишеней.

Применение современных методов исследования (включение изотопной метки в сочетании с действием антиметаболитов и ингибиторов различных этапов биосинтеза макромолекул, седиментационный анализ отдельных фракций РНК и т. д.) привело к значительным успехам в идентификации первичных звеньев метаболизма клеток, подвергающихся действию гормонов. Буквально в течение последних лет в этой области произошел настоящий переворот, и было сформулировано представление о возможности активации гормонами генетического аппарата клетки.

Однако результаты этих работ, несмотря на все их значение, не дают ответа на вопрос о том, каким образом первоначальная активация гена гормоном приводит в действие всю цепь событий, завершающихся делением клетки. Имеющиеся данные относятся, как правило, лишь к первым часам после воздействия на органы-мишени, когда еще отсутствуют изменения в числе митозов. Кроме того, биохимические анализы проводятся обычно на гомогенатах целого органа, реже — ткани, что исключает возможность исследования нарушений, вызываемых гормонами в пределах популяции клеток.

Цитологическое направление в изучении действия гормонов на органы-мишени значительно уступает по достигнутым успехам биохимическому. Основными методическими приемами в этой области являются сопоставление морфологических изменений клеток с данными гистохимических реакций, а также определение митотического индекса ткани. Поскольку сдвиги митотического индекса, отражающие изменения числа делящихся клеток, являются объективным количественным критерием наблюдаемых изменений, последний метод получил наибольшее распространение и способствовал накоплению фактического материала, послужившего основой создания ряда концепций по вопросу о способах гормональной регуляции деления клеток. Однако в силу отсутствия адекватных методов исследования, которые позволяли бы устанавливать точки приложения действия гормонов в тканях различного типа на разных этапах подготовки клеток к де-

лению, ни одна из этих концепций не была подвергнута строгой экспериментальной проверке.

С развитием радиоавтографических исследований появилась возможность не только проверить правильность существующих представлений о путях воздействия гормонов на деление клеток, но и углубить изучение этого вопроса. Применение метода радиоавтографии с использованием специфического предшественника ДНК — H^3-тимидина позволило нам предпринять сравнительное изучение гормональной регуляции деления клеток в ткани-мишени и ткани, не обладающей специфичностью по отношению к гормону.

В результате проведенного исследования были получены новые данные о путях воздействия гормонов на митотические циклы и митотический режим в тканях различной специфичности и конкретизировано понятие ткани-мишени по отношению к некоторым гормонам. Вместе с тем использование гормонов как регуляторов митотического деления позволило установить ряд закономерностей в прохождении клетками митотического цикла и сформулировать некоторые положения, касающиеся общих принципов его регуляции.

Настоящая монография является в известном смысле итогом выполненного исследования, а также обобщением многочисленных данных литературы, посвященной проблеме гормональной регуляции размножения клеток и смежным вопросам. Мы не ставили себе целью дать исчерпывающий обзор всех работ по изучению действия гормонов на процессы клеточного размножения. Книга представляет собой скорее попытку развернутого анализа основных закономерностей гормональной регуляции размножения клеток. Задача изложения была сознательно ограничена рассмотрением действия главным образом одной группы гормонов, а именно, эстрогенов, являющихся специфическими стимуляторами процессов роста в органах воспроизводящей системы и некоторых железах внутренней секреции. Широкое применение эстрогенов в целях терапии ряда злокачественных опухолей делает особенно важным выяснение их роли в регуляции деления клеток.

Автор выражает искреннюю признательность своим друзьям и товарищам по работе, принимавшим участие в обсуждении отдельных разделов монографии, и считает долгом принести глубокую благодарность Истану Санджиевичу Башкаеву, Надежде Владимировне Валеевой и Кларе Григорьевне Парсадановой, оказавшим большую помощь при оформлении и подготовке рукописи к печати.

Глава I.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

1. БИОЛОГИЧЕСКИЙ СМЫСЛ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК. МИТОЗ И ЕГО ОСОБЕННОСТИ

Открытие митоза и его назначение. Как это нередко бывает с великими открытиями, истинный смысл клеточного деления был постигнут лишь много лет спустя после того, как этот феномен впервые описали Прево и Дюма (Prévost et Dumas, 1824a, в, с), наблюдавшие дробление яиц у животных. Известная доля вины в этом ложится на создателей клеточной теории Шлейдена (Schleiden, 1838) и Шванна (Schwann, 1839), допускавших свободное образование клеток из бластемы. Так или иначе, открытие митоза отделяет от опытов Прево и Дюма целое пятидесятилетие.

В 1874 году в итальянском ботаническом журнале было напечатано сообщение И. Д. Чистякова «Материалы к истории растительной клетки», в котором появилось указание на особую форму клеточного деления.

Последовала серия классических работ Страсбургера (Strasburger, 1875, 1880), Бючли (Bütschli, 1876), Шлейхера (Schleicher, 1878, 1879) и Перемежко (1878, 1879), описавших отдельные фазы деления; Флемминга (Flemming, 1878, 1879, 1882 и др.) открывшего различные типы деления ядра; Вальдейера (Waldeyer, 1888), охарактеризовавшего хромосомы, и др. (подробно см. Кацнельсон, 1959, 1963; Бляхер, 1963).

Эти исследования показали, какой сложный и тонкий механизм лежит в основе клеточного размножения. Однако действительное назначение этого механизма удалось оценить после того, как была доказана роль ядерных структур в передаче наследственных признаков (см. Morgan, 1920). Постепенно сформировалось новое научное направление — цитогенетика, подробно освещенное в книге Белара «Цитологические основы наследственности» (Bělař, 1928).

Пожалуй, с наибольшим лаконизмом сущность процесса клеточного деления охарактеризовал современник этого открытия Эдмунд Вильсон, сказавший, что «от клеточного деления зави-

сят не только явления наследственности, но и сама непрерывность жизни» (E. B. Wilson, 1925, русск. пер. 1936, стр. 103). Несмотря на колоссальный прогресс знаний в области цитологии и генетики, к этому положению мало что можно добавить и теперь, и ведущие цитологи нашего времени лишь развивают формулировку Вильсона (см. Ris, 1955; Brachet, 1957; Mazia, 1960a, b, 1961a, b; P. Weiss, 1962).

По образному выражению Мэзия (Mazia, 1961a), деление обеспечивает «биологическое бессмертие» клеток путем непрерывного обновления цитоплазмы. Непрерывность поддержания жизни клетки (biological conservation) требует в свою очередь точного воспроизведения ее организации, то есть всех ее структур и прежде всего генетического материала, заключенного в ядре. Равномерное распределение наследственного материала между двумя дочерними (сестринскими) клетками обеспечивается митозом, представляющим собой сложный процесс структурных преобразований и передвижений внутриклеточных компонентов, завершающийся делением клетки.

В настоящее время большинством исследователей признается, что митоз является наиболее древним способом клеточного размножения, а все остальные формы деления возникли в процессе эволюции как его регуляционные или патологические видоизменения (см. Ris, 1955; Andersson, 1956; Gross, 1957; Кнорре, 1959; Mazia, 1961a; Жинкин, 1962, и др.). В основе этого взгляда лежит представление о митозе как о наиболее логичном способе равномерного распределения наследственного материала.

Организация митоза. Для равномерного распределения наследственного материала необходима его предварительная упаковка в небольшое количество структурных единиц — хромосом, число которых постоянно для каждого вида животных. В хромосомах содержатся материальные носители наследственности гены — дискретные единицы, играющие основную роль в детерминации жизненных функций организма. Вопрос о механизмах функционирования генов будет рассмотрен в следующем разделе главы.

Хромосома представляет собой постоянный структурный компонент ядра, способный к самовоспроизведению и сохранению основных свойств на протяжении последовательного ряда клеточных делений. В процессе своего развития хромосомы претерпевают закономерный цикл спирализации, отражающий особенности их функционирования (подробно о строении и функции хромосом см. Прокофьева-Бельговская и Богданов, 1963).

Каждая хромосома состоит из двух нитей — хроматид, образуемых в свою очередь двумя субъединицами, и т. д. Такой принцип организации является, по-видимому, оптимальным для осуществления основных процессов, развертывающихся на

протяжении митоза — продольного расщепления хромосом и составляющих их единиц (хромосом — на дочерние хромосомы, хроматид — на полухроматиды и т. д.) с последующим расхождением к полюсам клетки. Именно эти два события обеспечивают равномерное распределение между двумя клетками наследственного материала, от которого зависит дальнейшая судьба клеток. В этом смысле все предшествующие этапы митотического цикла, как бы существенны они ни были, Мэзия (Mazia, 1960a) справедливо предлагает считать предысторией митоза.

Передвижение хромосом к полюсам делящейся клетки достигается при участии специального ахроматинового, или делительного, аппарата[1], состоящего из центриолей, или митотических центров, звезд, или астральной лучистости, и нитей веретена (рис. 1, *1*), с которыми хромосомы соединены при помощи кинетохоров (центромеров).

Кинетохоры, являющиеся морфологически обособленными участками самих хромосом, по-видимому, несут важную функцию передвижения последних, что было показано разными методами. К сожалению, ввиду малых размеров кинетохоров, до сих пор почти ничего не известно об их составе, строении и редупликации, хотя некоторые исследователи, например, Мэзия, приписывают им ведущую роль в распределении наследственных признаков.

Собственно митозом[2] называют небольшой по времени этап жизненного цикла клетки с момента оформления хромосомного вещества в видимые под микроскопом нити до образования двух новых клеток из одной. Выделение этого этапа из общей цепи событий удобно с точки зрения морфолога; в физиологическом же отношении митоз правильнее рассматривать как конечный этап митотического цикла, который лишь завершает серию подготовительных реакций, протекающих в интервале между делениями, то есть в интерфазе (в интеркинезе). Противопоставление митоза интеркинезу как активного состояния клетки фазе ее «покоя» в свете современных данных является неточным. Подробные сведения о событиях, происходящих на протяжении митотического цикла, будут изложены в гл. II.

Митоз протекает в несколько характерных последовательных фаз, или стадий (см. E. B. Wilson, 1925; Mazia, 1956; Brachet, 1957, и др.), которые изображены на рис. 1 и 2.

---

[1] Термином митотический аппарат обычно обозначают совокупность ахроматинового аппарата и хромосом.

[2] От греческого μιτος — нить (термин, введенный в 1882 г. Флеммингом). Реже употребляется термин кариокинез, от греч. χάρυον — орех, ядро и χινησις — движение), введенный в 1878 г. Шлейхером.

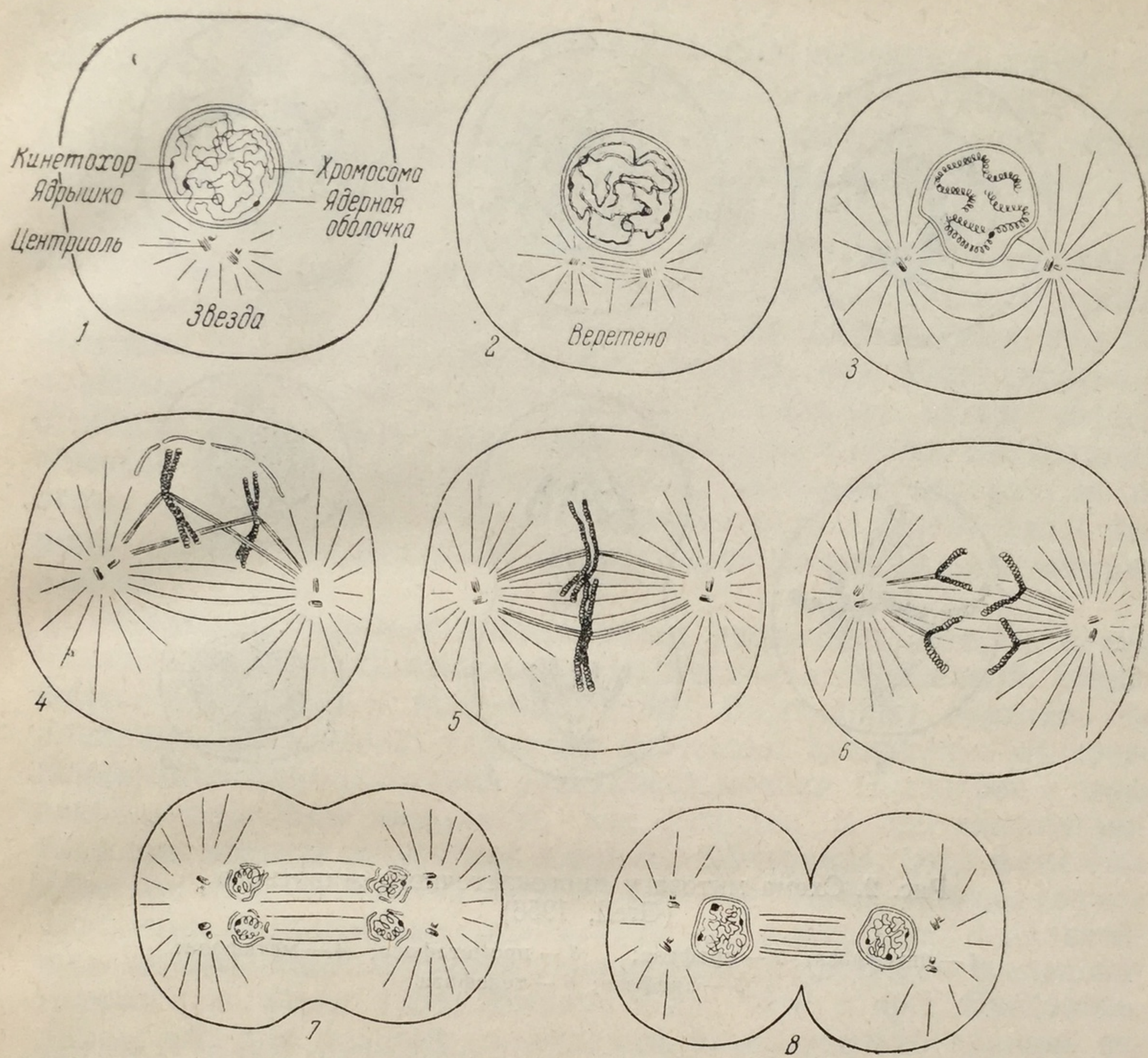


Рис. 1. Последовательные стадии митоза — общая схема (Mazia, 1961 c)

1 — интерфаза; *2* — начало митоза; *3, 4* — профаза; *5* — метафаза; *6* — анафаза; *7, 8* — телофаза

1. Профаза. Ядро увеличивается в размерах; хромосомы состоят из двух морфологически идентичных взаимно переплетенных хроматид, которые постепенно утолщаются и укорачиваются (спирализуются). Ядрышко исчезает, а разделившиеся митотические центры вместе с лучистостью перемещаются к противоположным сторонам ядра, образуя два клеточных полюса. Ядерная оболочка разрушается, и ядерный сок (нуклеоплазма) смешивается с цитоплазмой; возникают нити веретена.

2. Метафаза. Хромосомы расплетаются, и две хроматиды располагаются параллельно; их спирализация достигает максимальной степени. Одновременно происходит перемещение хромосом к экваториальной плоскости веретена (метакинез) и прикрепление к его нитям (образование экваториальной пластинки).

3. Анафаза. Хроматиды, состоящие уже из двух полухроматид, передвигаются при участии веретена по направлению к

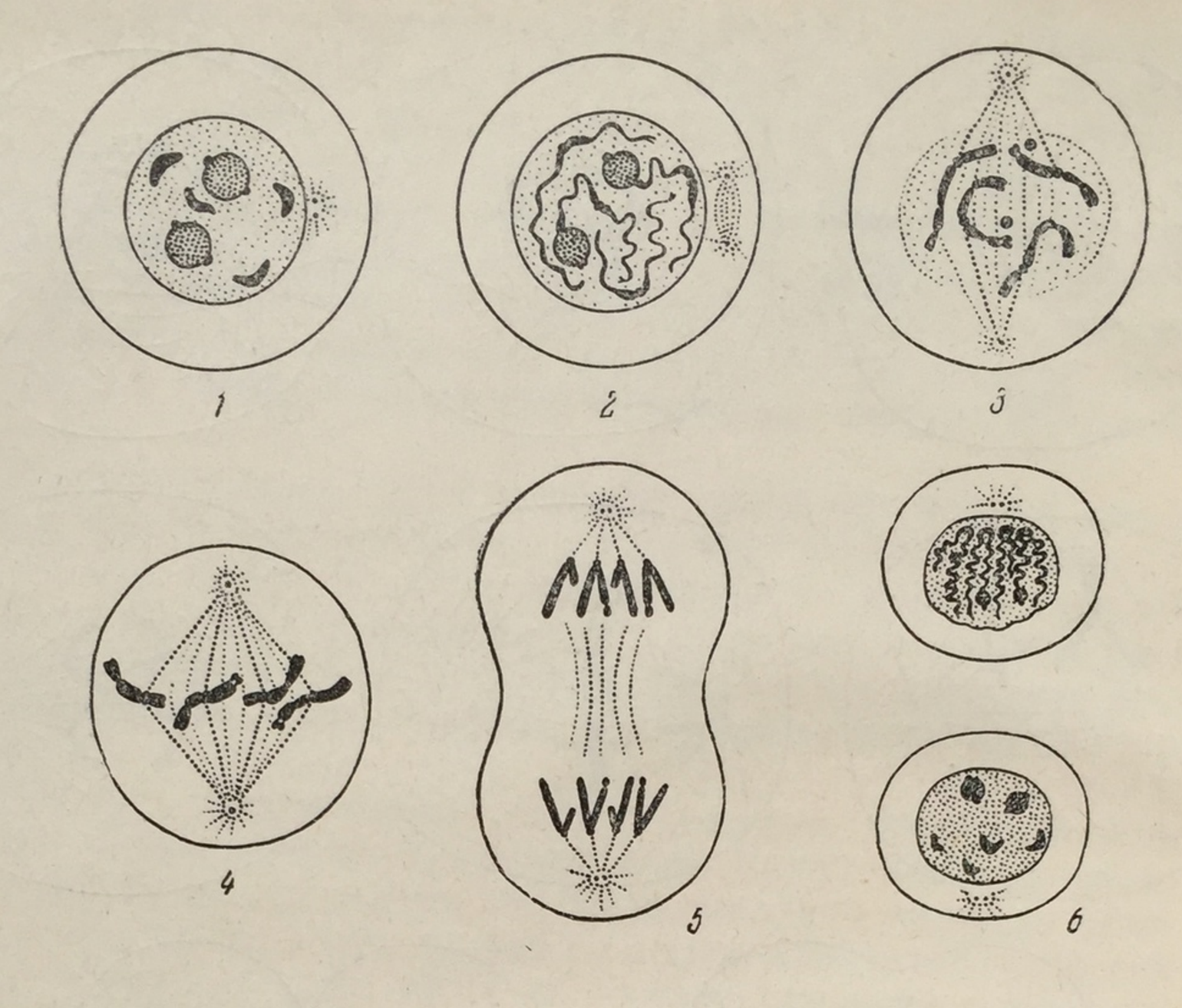


Рис. 2. Схема митоза у многоклеточного животного (Grell, 1956)

1 — интерфаза; *2* — профаза; *3* — прометафаза; *4* — метафаза; *5* — анафаза; *6* — телофаза

митотическим центрам, то есть к противоположным полюсам клетки. Звезды достигают значительного развития.

4. Телофаза. Хромосомы сближаются у митотических центров, деспирализуются и постепенно становятся неразличимыми. Образуются ядерная оболочка и ядрышко. Ахроматиновый аппарат регрессирует. Митоз завершается делением клетки (цитотомия, или цитокинез).

Поскольку митоз представляет собой единый и непрерывный процесс, границы между отдельными его этапами не всегда могут быть четко выявлены. Часто в пределах одной и той же стадии митоза различают раннюю и позднюю фазы (например, раннюю и позднюю профазу); иногда бывают хорошо выражены переходные состояния (прометафаза, отражающая метакинез); наконец, на некоторых объектах удается подобрать критерии для описания восьми и более фаз митоза (De Robertis et al., 1960; Lettré, 1961a).

При этом естественно, что отдельные детали митоза в большей или меньшей степени варьируют в разных клетках. Так, например, в клетках растений не обнаружены даже с помощью электронного микроскопа митотические центры или их аналоги,

и вопрос о том, что поляризует в процессе деления растительную клетку, до сих пор является открытым. Особенно сильные отклонения от типичной картины митоза наблюдаются у простейших; но все они касаются в основном второстепенных признаков, а генеральный план митоза остается общим для всех видов.

Взаимоотношение компонентов митоза. Совершенно очевидно, что для нормального разделения клетки необходима строгая согласованность поведения отдельных ее компонентов. Это положение послужило отправным пунктом для многочисленных попыток вмешаться в нормальный ход митоза путем воздействия на те или иные клеточные структуры с целью обнаружить единый пусковой механизм деления. Большая литература по этому вопросу собрана и систематизирована в статье Александрова (1962), посвященной организации митотического деления клетки.

Анализ экспериментальных работ различных авторов, в том числе данных микрокинематографических исследований (Molè-Bajer, 1958; Bajer a. Molè-Bajer, 1960; Bajer, 1961), показал, что превращения ядерных структур протекают независимо от поведения цитоплазматических участников митоза. Последние в свою очередь способны выполнять свои функции на протяжении митоза при полном отсутствии ядерного материала. Этот факт был известен еще со времен Бовери (Bovery, 1895), наблюдавшего дробление безъядерных фрагментов яиц иглокожих. В дальнейшем он был многократно воспроизведен различными исследователями (см. Stern, 1956; Шапиро и др., 1960, и др.). Оказалось, далее, что для деления цитоплазмы необязательно наличие веретена, звезд и митотических центров (Hiramoto, 1956; Lettré, 1956, 1961a).

Суждения о независимом поведении (диссоциабильности) клеточных компонентов в митозе («Dissoziabilität einzelner Mitoseschritte») высказывались еще во времена классической цитологии, но тогда исследователи не располагали достаточным количеством фактов для подтверждения своих взглядов. Наиболее сложным в этой проблеме является вопрос о том, каким образом осуществляется временна́я и пространственная координация поведения участников митоза при видимом отсутствии их взаимного влияния.

Рассматривая имеющийся фактический материал по клеточному размножению и привлекая данные из области эмбриологии, Александров предлагает отнести митоз к категории процессов, протекающих по типу независимой дифференцировки. Выдвигая это представление, Александров исходит из того, что принцип строгой координации поведения компонентов системы при отсутствии взаимообусловливающих отношений между ними свойствен широкому кругу биологических явлений самой различной сложности. По-видимому, такой характер

организации процесса биологически выгоден, поскольку он обеспечивает возможность создания в филогенезе наиболее оптимальных вариантов процесса, каковыми являются, в частности, многочисленные формы митоза.

Несмотря на то, что несколько непривычное определение митоза как морфогенетического процесса не встречает пока поддержки у некоторых цитологов (см. Жинкин, 1963, а также отчет о совещании по митозу — Залкинд, 1961), попытка отнести митоз к данному классу явлений, с нашей точки зрения, перспективна, так как она помогает найти новые подходы к его изучению. Сходные мысли были высказаны в работе Стерна и Хотта (Stern a. Hotta, 1963a).

Упрек, который можно сделать авторам изложенных выше представлений, заключается в том, что хотя при описании независимости действия компонентов митоза совершенно правильно ставится вопрос о временно́й и пространственной координации процесса, дело, как правило, ограничивается рассмотрением только последней. Все примеры, приводимые в подкрепление выдвигаемого принципа, касаются этапов видимого под микроскопом митоза, то есть ограниченной по времени части митотического цикла.

По-видимому, это связано с тем, что до недавнего времени сведения о событиях, предваряющих митоз, были крайне скудными. Между тем, как уже отмечалось, митотический цикл включает в себя серию подготовительных процессов, строго детерминированных во времени и обусловливающих протекание последних этапов цикла, в том числе видимых фаз митоза (см. гл. II).

Характерно, что даже в пределах самого митоза временна́я зависимость событий выступает очень отчетливо. Так, например, в приводимой Александровым работе Циммермана и Марсланда (Zimmerman a. Marsland, 1960) дробление яиц морского ежа Arbacia punctulata в отсутствие ахроматинового аппарата после центрифугирования при высоком гидростатическом давлении наступало лишь в том случае, если воздействие начиналось через 12 мин. после оплодотворения; вмешательство на более ранних стадиях блокировало цитокинез. Недавно Циммерман (Zimmerman, 1963) опубликовал продолжение этих исследований; с помощью меченых соединений он показал, что реакция отдельных компонентов митотического аппарата на центрифугирование зависит от времени воздействия. В уже упоминавшейся работе Хирамото (Hiramoto, 1956) дробление яиц протекало и после удаления веретена и звезд, но лишь в том случае, если вмешательство производилось не раньше, чем на стадии анафазы.

К настоящему времени в этом направлении собран уже достаточный материал, позволивший сделать ряд принципиальных обобщений относительно причинной обусловленности событий митотического цикла (см. гл. II).

Некоторые вопросы механизмов митоза. Очень существенным в этой проблеме является вопрос о природе структурных преобразований, приводящих к возникновению ахроматинового аппарата из материала интерфазной клетки. В этом направлении большое количество исследований было выполнено Гейльбруном и его школой (см. Heilbrunn, 1956).

Гейльбрун и другие установили, что в период, предшествующий митозу, происходит резкое повышение вязкости цитоплазмы. Этот переход цитоплазмы из состояния золя в гель рассматривается как необходимое предварительное условие образования ахроматинового веретена. Гейльбрун приводит доказательства, что вязкость цитоплазмы изменяется вследствие перехода ионов кальция из кортикального слоя клеток (где кальций обычно находится в связанном состоянии) в эндоплазму. Гросс (Gross, 1957) объясняет освобождение кальция изменениями способности кортикальных белков связывать катионы. По представлениям Андерсона (Andersson, 1956; Andersson et al., 1960), главную роль в этом процессе играют органические поликатионы (подробно см. Цанев и Марков, 1964а).

Одной из центральных проблем в области механизмов митоза является также вопрос о природе сил, вызывающих перемещение хромосом к полюсам в анафазе. В этой области выполнено огромное количество экспериментальных и теоретических исследований.

Согласно современным представлениям, это перемещение достигается взаимодействием двух одновременно протекающих процессов: сокращением нитей веретена, связывающих хромосомы с полюсами, и удлинением нитей, соединяющих оба полюса. Что касается механизма сократительных движений, то в настоящее время наиболее распространенной является теория, в основе которой лежит представление об однотипности всех контрактильных систем живой природы, обусловленной сходством сократительных белков.

На основании опытов, в которых была установлена общность реакции на АТФ глицериновых моделей мышечных волокон и ахроматинового аппарата (Hoffmann-Berling, 1959, и др.), а также работ Мэзия с сотрудниками (Mazia, Chaffee a. Iverson, 1961) и др. (Miki, 1963; Hartmann, 1964), обнаруживших в митотическом аппарате типичную АТФ-азу, возникло представление о том, что сокращение нитей веретена происходит в результате взаимодействия между актиноподобным белком и АТФ, сопровождающегося энзиматическим расщеплением макроэргических связей (подробно см. Поглазов, 1961).

Не менее важной является проблема механизмов цитокинеза (см. Зотин, 1962; Hiramoto, 1963a, b; Wolpert, 1963). Детальное изложение материалов, относящихся к исследованию различных сторон механизмов митоза, содержится в трудах Вассер-

мана (Wassermann, 1926, 1939), Шрадера (Schrader, 1944, 1953), Хьюза (A. Hughes, 1952) и многих других. Современное состояние вопроса освещено в статьях и книгах Мэзия (Mazia, 1956, 1959, 1961a), Браше (Brachet, 1957), Де Робертиса и др. (De Robertis et al., 1960), Циммермана (Zimmerman, 1960), Белла (Bell, 1961, 1963), Робертса (Roberts, 1961), Детлаф (1962, 1963), Кувады (Kuwada, 1963), Фотрэ (Fautrez, 1963), Цанева и Маркова (1964a) и других.

Специфические черты митоза как биологического процесса. Заключая настоящий раздел, следует отметить, что митозу (как и митотическому циклу) присущи именно те свойства, которые Энгельгардт (1960), разбирая атрибуты живого, назвал наиболее специфическими чертами биологического обмена веществ. Одна из таких характерных черт — проявление «единства во множестве, тождества в многообразии»; при этом имеется в виду, что на всех ступенях развития живого мира можно встретить процессы, сходные не только по конечному эффекту, но тождественные и во всех деталях составляющих их реакций. Этот принцип в полной мере может быть отнесен к митозу, являющемуся основным и, по-видимому, филогенетически наиболее рано возникшим способом клеточного размножения организмов.

Как уже говорилось, у разных форм варьируют только второстепенные его признаки, но и это не является правилом. Применение тонких методов окрашивания позволило обнаружить митоз у ряда грибов (Turian a. Cantino, 1960; Dowding a. Weijer, 1960; Ward a. Ciurysek, 1962; Robinow, 1963). Полноценный митоз описан у дрожжевых клеток Lipomyces lipofer (Robinow, 1961). О глубокой общности не только самого митоза, но и процессов подготовки к нему у различных форм свидетельствует возможность искусственной синхронизации делений одним и тем же воздействием (низкая температура) таких филогенетически далеких объектов, как микроорганизмы и клетки млекопитающих (см. обзор Ломакиной, 1963). Этот факт указывает на необычайную стойкость выработанного механизма.

Второй специфической чертой биологического обмена веществ по Энгельгардту является цикличность протекания важнейших превращений. Этот принцип полностью применим к характеристике митотического цикла, одним из этапов которого является митоз («пусковые механизмы» митотического цикла обсуждаются в следующей главе).

Наконец, еще одной отличительной чертой обмена следует считать наличие явлений авторегуляции при протекании важнейших метаболических процессов. В первую очередь это относится к так называемым ключевым, или тахостатическим[3], реакциям, определяющим скорость процесса. Как будет

[3] От греческого ταχος — скорость и στατος — стоящий.

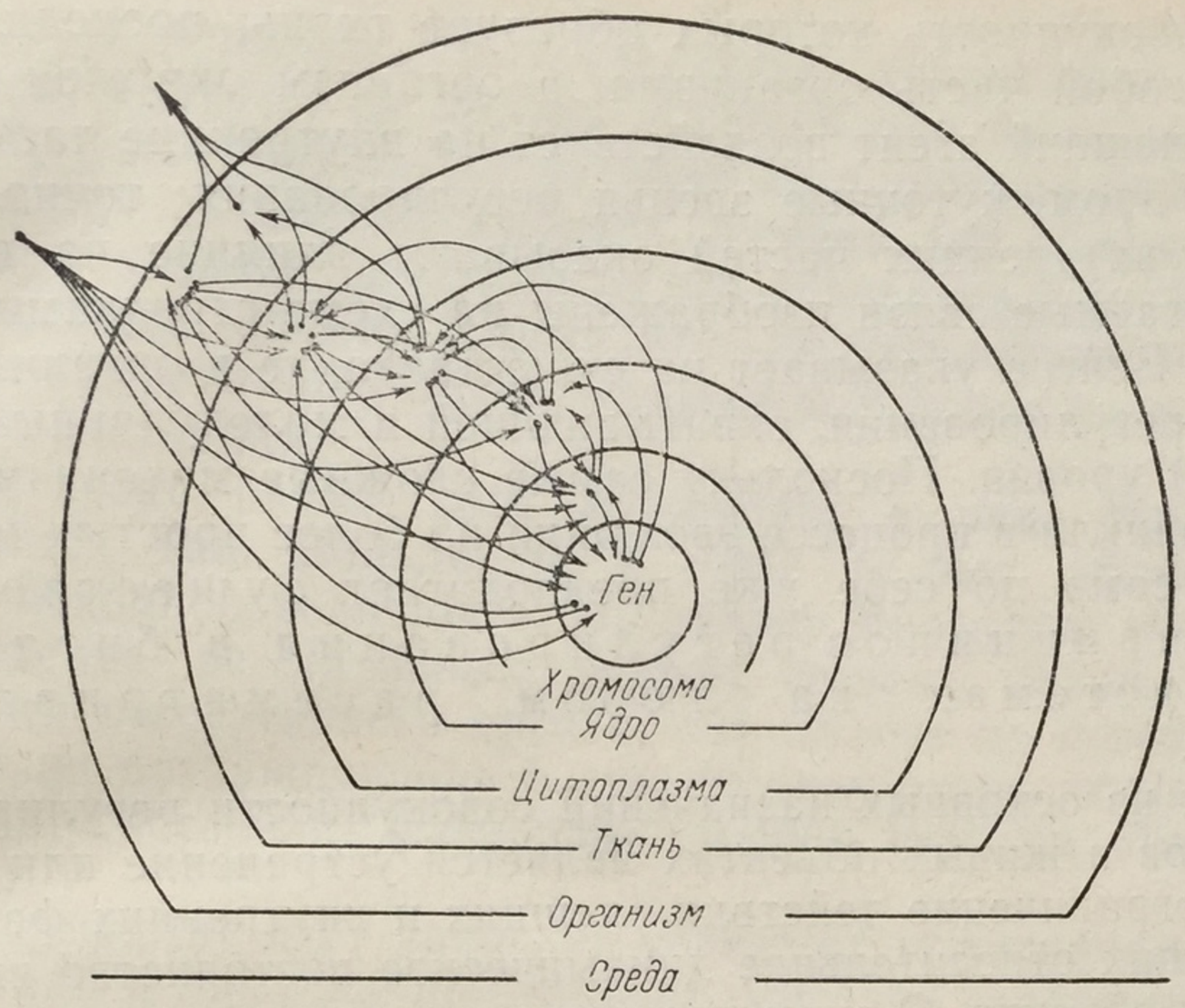


Рис. 3. Схема сложной сети возможных взаимодействий в организме (P. Weiss, 1960)

видно из дальнейшего (см. гл. II), они играют ведущую роль в процессах, развертывающихся на протяжении митотического цикла, определяя переход от одного этапа цикла к другому и, возможно, являясь одновременно точками приложения действия факторов, контролирующих деление клеток. Строгая детерминация этих реакций во времени обеспечивает в конечном счете авторегуляцию самого митоза.

Прежде, чем перейти к рассмотрению литературы по регуляции митотического деления, необходимо кратко остановиться на основных принципах регулирования в живых системах.

2. О РЕГУЛИРОВАНИИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Все биологические образования характеризуются наличием более или менее сложной системы регуляторных механизмов, обеспечивающих возможность их приспособления к изменяющимся условиям (см. Шмальгаузен, 1964). В пределах живого организма можно выделить различные уровни («этажи») регуляции, складывающиеся в определенный иерархический порядок регулирования.

На рис. 3 представлена упрощенная схема сложной сети возможных взаимодействий в организме, заимствованная из статьи Вейсса (P. Weiss, 1960). В центре схемы изображен ген, заключенный в хромосому; хромосома находится в ядре, расположенном в цитоплазме; цитоплазма является составной частью

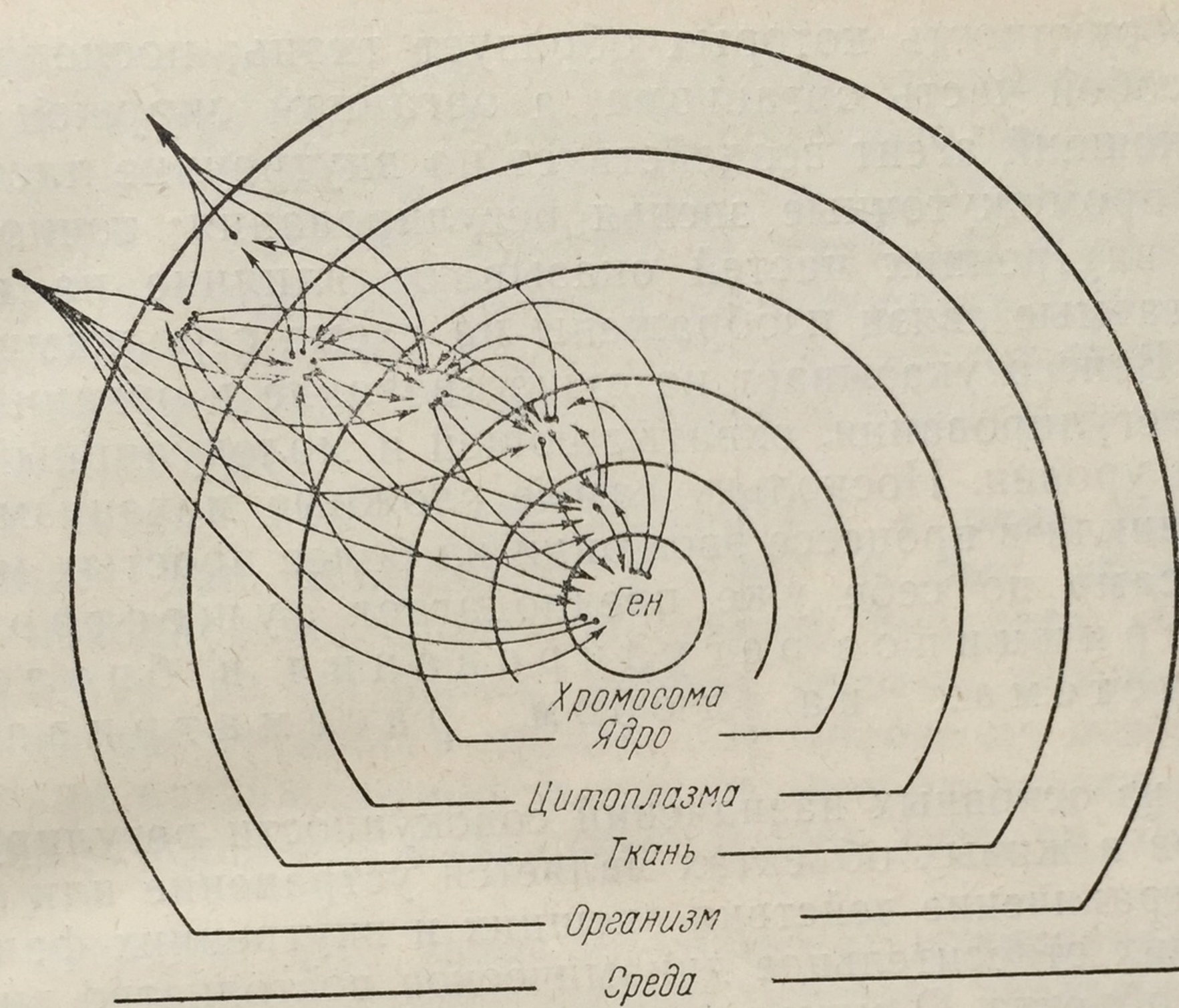


Рис. 3. Схема сложной сети возможных взаимодействий в организме (P. Weiss, 1960)

видно из дальнейшего (см. гл. II), они играют ведущую роль в процессах, развертывающихся на протяжении митотического цикла, определяя переход от одного этапа цикла к другому и, возможно, являясь одновременно точками приложения действия факторов, контролирующих деление клеток. Строгая детерминация этих реакций во времени обеспечивает в конечном счете авторегуляцию самого митоза.

Прежде, чем перейти к рассмотрению литературы по регуляции митотического деления, необходимо кратко остановиться на основных принципах регулирования в живых системах.

2. О РЕГУЛИРОВАНИИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Все биологические образования характеризуются наличием более или менее сложной системы регуляторных механизмов, обеспечивающих возможность их приспособления к изменяющимся условиям (см. Шмальгаузен, 1964). В пределах живого

клеток, совокупность которых образует ткань; последняя представляет собой часть организма, а организм окружен внешней средой. Внешний агент воздействует на внутренние части системы через промежуточные звенья регулирования; точно так же продукты внутренних частей оказывают влияние на внешние. Предполагаемые связи изображены на схеме стрелками.

Схема Вейсса указывает на существование в организме единой сети регулирования, охватывающей и молекулярный и надклеточный уровни. Поскольку самые сложные механизмы регуляции возникли в процессе эволюции из более простых механизмов, это само по себе уже предполагает существование общих принципов регулирования в биологических системах на любом рассматриваемом уровне.

Одним из основных назначений совокупности регулирующих механизмов в живых объектах является устранение или максимальное ограничение действия внешних и внутренних факторов, нарушающих относительное динамическое постоянство внутренней среды объекта. О существовании в самом организме систем, направленных на поддержание его равновесия и функциональной устойчивости, говорил в своих «Лекциях о телесных жидкостях» еще Клод Бернар (Bernard, 1855, 1856), провозгласивший принцип постоянства внутренней среды организма.

Для характеристики приспособительных реакций организма к изменяющимся условиям среды Уолтером Кенноном (см. Cannon, 1929) был предложен термин «гомеостаз», получивший впоследствии широкое распространение в биологии (см. Heilbrunn, 1953; Villee, 1961; Коштоянц, 1961; Поупа, 1961, и др.). В 1930 году Хиллом (Hill, 1930, 1931) было введено другое важное понятие — так называемое стационарное состояние (steady state) живых систем. Хилл исходил из представления о том, что во внутренней среде высокоорганизованных существ не может идти речь о простом термодинамическом равновесии. Высокая степень постоянства физико-химических факторов, обеспечивающих устойчивое состояние живого организма, достигается утонченным балансом непрерывно протекающих динамических процессов. Таким образом, постоянство внутренней среды организма обеспечивается не равновесием, а тонкой регулировкой различных процессов, которую производит совокупность клеток и которая способствует сохранению устойчивости системы. В последнее время представление о стационарном состоянии широко используется при анализе процессов, развертывающихся на протяжении митотического цикла (Quastler, 1960, и др., см. гл. VIII).

Значительным вкладом в разработку проблем авторегуляции живых систем можно считать учение И. П. Павлова об условных и безусловных рефлексах (см. Павлов, 1923, и др.),

из которого следует, что назначением механизмов внутренней регуляции является не только поддержание постоянства среды, но также непрерывное приспособление и совершенствование организма при изменении внешних условий для обеспечения наиболее эффективной работы всех его элементов. Смысл процесса авторегуляции сводится к тому, что само отклонение от нормального уровня функции служит стимулом к восстановлению нарушенного состояния.

Этот тезис нашел свое выражение в ряде теоретических обобщений. Так, Вильдером в 1931 г. был сформулирован «закон исходной величины». По закону Вильдера, «чем сильнее возбуждение вегетативных нервов, степень напряжения деятельности вегетативного органа, тем слабее их возбудимость в отношении возбуждающих и тем сильнее их реактивность в отношении угнетающих факторов» (Wilder, 1931; см. Лейтес, 1939, стр. 31).

По существу этот закон не содержит принципиально новых положений и лишь конкретизирует основное содержание учения Н. Е. Введенского о существовании для каждого данного состояния возбудимой ткани оптимума и пессимума силы и частоты раздражений, обеспечивающих максимальный эффект (Введенский, см. Полн. собр. соч., 1951). Позднее закон Вильдера получил известность в более широкой трактовке как «правило исходного состояния» Вильдера — Лейтеса, согласно которому состояние функциональной напряженности физиологического процесса является фактором, определяющим характер реакции данной системы на раздражитель (Лейтес, 1934, 1939, 1945). Крупными достижениями в развитии идеи авторегуляции явились учение Селье (Selye, 1936, 1950, 1952, 1954, 1956, 1958, и др.) об адаптационном синдроме и «принцип плюс-минус взаимодействия» Завадовского (1941), о которых будет идти речь в других главах.

Интерес к изучению процессов регулирования в биологических системах особенно возрос после выхода в свет книги Норберта Винера «Кибернетика» (Wiener, 1948), положившей начало новой науке об общих закономерностях строения управляющих систем и принципов управления в живой природе, в обществе и в технике.

Согласно современным представлениям (см. Oppelt, 1956; Drischel, 1956; Ляпунов и Яблонский, 1963, и др.), всякое управление осуществляется посредством передачи информации. Кибернетика изучает процессы хранения, передачи, переработки и восприятия информации, способы ее кодирования, а также методы переработки информации и устройства, выполняющие эту переработку; она выявляет элементарные управления, их взаимодействие, иерархию, связь между строением и функцией управляющих систем.

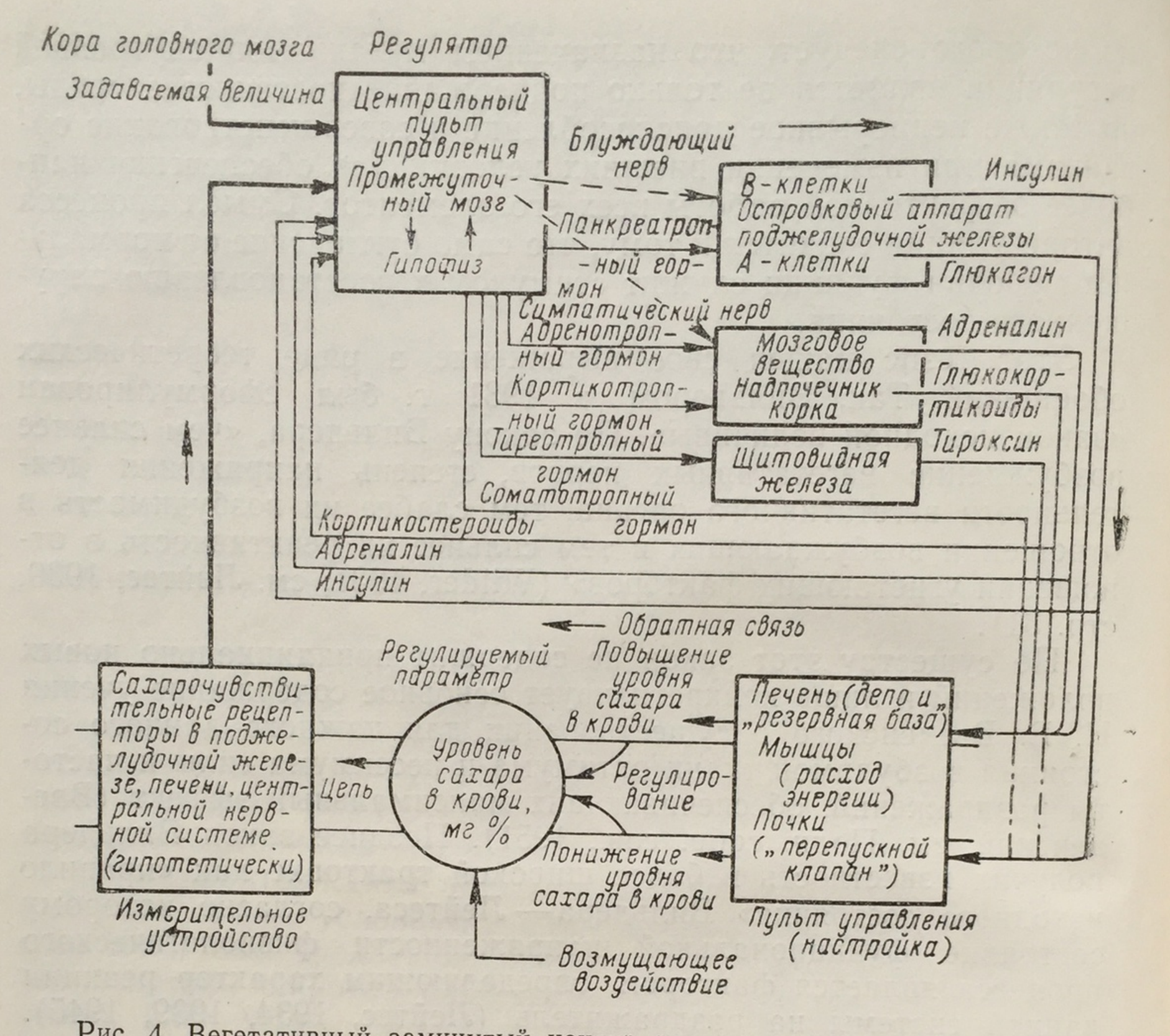


Рис. 4. Вегетативный замкнутый контур регулирования уровня сахара в крови (Drischel, 1956)

Информация передается по цепи регулирования. Под регулированием обычно понимают принудительное обеспечение некоторого желаемого состояния системы путем непрерывного контролирования фактического ее состояния и воздействия на него, как только оно отклоняется от заданного. Элемент цепи регулирования, изменение положения или состояния которого оказывает регулирующее воздействие, называется регулирующим органом. Так, например, биологическими регулирующими органами в системе регулирования уровня сахара в крови служат печень (депо углеводов), мышцы (главные потребители углеводов) и почки («перепускной клапан» избыточного количества сахара). Центральным пультом управления, или регулятором, данной системы является комплекс промежуточный мозг — гипофиз (рис. 4). В цепи регулирования в каждый данный момент существует определенное равновесие. Смена во времени этих состояний равновесия и составляет в конечном счете тот упорядоченный процесс регулирования, ко-

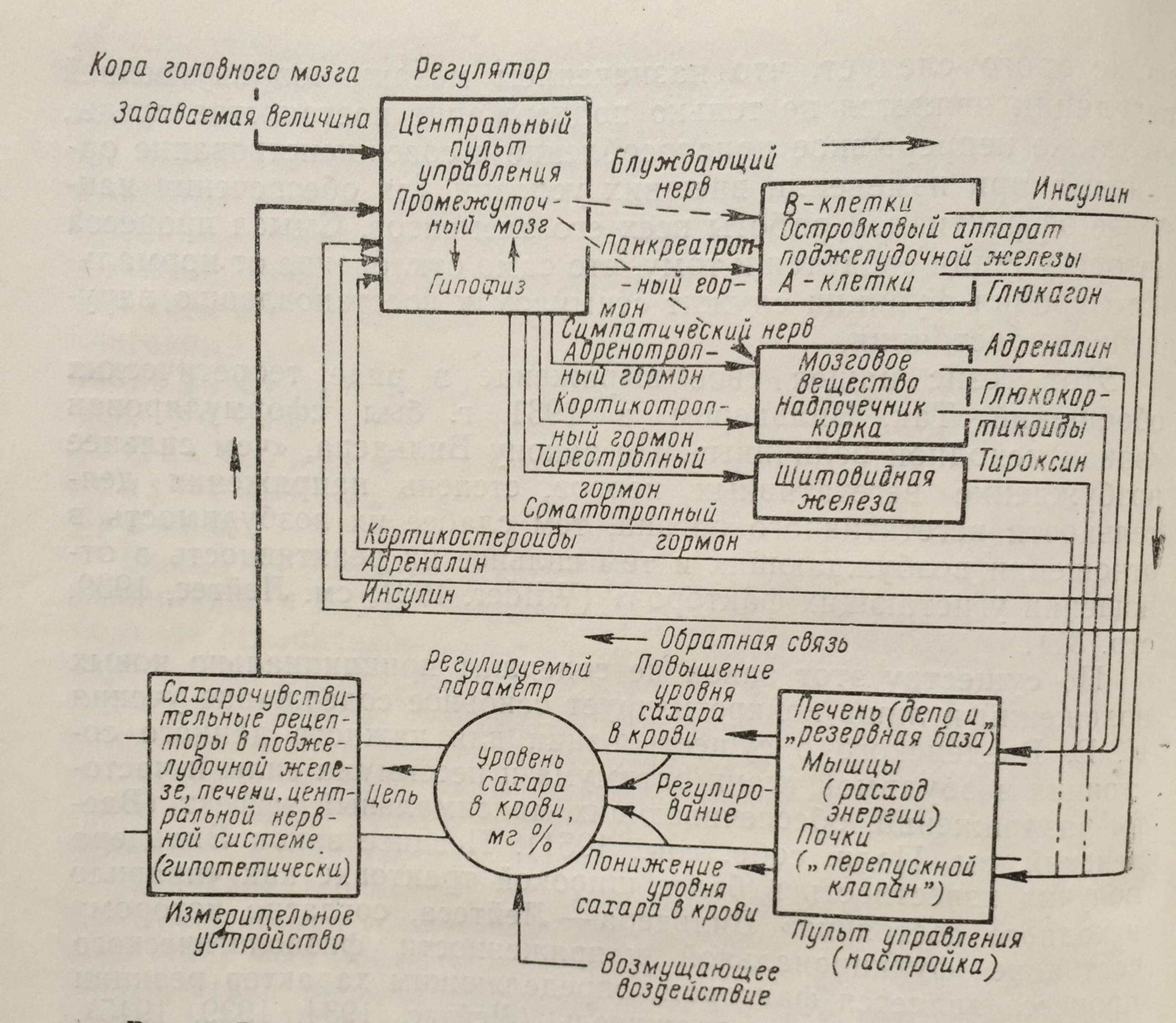


Рис. 4. Вегетативный замкнутый контур регулирования уровня сахара в крови (Drischel, 1956)

Информация передается по цепи регулирования. Под регулированием обычно понимают принудительное обеспечение некоторого желаемого состояния системы путем непрерывного контролирования фактического ее состояния и воздействия на него, как только оно отклоняется от заданного. Элемент цепи регулирования, изменение положения или состояния которого оказывает регулирующее воздействие, называется регулирующим органом. Так, например, биологическими

торый можно исследовать, наблюдая изменения регулируемой величины.

Вопрос о факторах, обеспечивающих равновесие системы, представляется чрезвычайно важным, так как он имеет непосредственное отношение к проблеме стабильности биологических образований. В последнее время, в связи с открытиями в области кода белкового синтеза и его регуляции, интерес к этой проблеме усилился (P. Weiss, 1962, 1963; B. E. Walker, 1963). Рассматривая клеточную популяцию в целом, Вейсс отмечает, что в каждый данный момент она варьирует значительно меньше, чем активность составляющих ее частей. В равной мере это относится к клетке, которая может погибнуть от неблагоприятного воздействия, но при всех видах вмешательств сохраняет свою индивидуальность. По-видимому, вопрос о том, каким образом в результате подвижности молекул, непрерывного расщепления и реконструкции макромолекул и всех клеточных компонентов обеспечивается стабильность биологических объектов, непосредственно связан с вопросом о непрерывной смене состояний равновесия в объектах.

Констатация того, что регулирующие воздействия в биологической системе однозначно предопределяют значение регулируемой величины, предполагает замкнутость системы. По мнению Коссá (Cossá, 1957), такие системы регулирования с замкнутым контуром и являются разгадкой той внутренней органической устойчивости, в которой Клад Бернар видел первую жизненную необходимость и которой было дано название гомеостазиса. Однако система в целом может быть подвержена внешним воздействиям.

Среди внешних воздействий различают возмущающие и управляющие воздействия. Первые вызывают такие изменения регулируемой величины, которые должны устраняться самой системой регулирования. Так, например, для системы регулирования уровня сахара в крови возмущающими воздействиями могут служить повышенное всасывание сахара в кишечнике после приема богатой углеводами пищи или внутривенное вливание глюкозы. Управляющие воздействия вызывают перенастройку регулятора на новое заданное значение регулируемой величины. В случае регулирования уровня сахара в крови управляющими воздействиями являются сигналы, передаваемые центральной нервной системой, и прежде всего корой больших полушарий, через главный пульт управления, то есть комплекс промежуточный мозг — гипофиз. Все эти сложные отношения в пределах единой стройной системы регулирования представлены схематически на рис. 4.

Кроме всего, что уже было сказано, представленная схема иллюстрирует принцип действия особого регуляторного механизма, так называемой обратной связи (feed-back mecha-

nism), обусловливающей замкнутость системы. В простейшем виде проявление действия обратной связи отражает известный принцип Ле Шателье, или закон смещения равновесия, согласно которому изменение внешних условий (температуры, давления и т. д.) физико-химической равновесной системы вызывает в ней реакции, противодействующие производимому изменению.

Однако действие принципа Ле Шателье ограничено случаями легко обратимых реакций. В биологических же объектах дей-

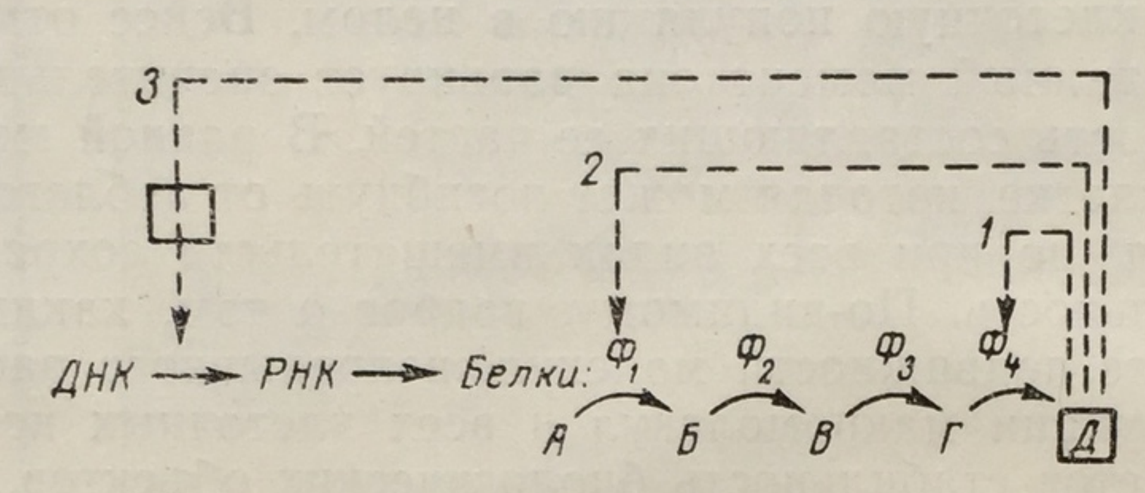


Рис. 5. Схема регулирования работы многоферментной системы продуктом по механизму отрицательной обратной связи (Кафиани, 1962)

1 — угнетение активности фермента непосредственным продуктом его действия (продуктное угнетение); *2* — угнетение конечным продуктом первого фермента цепочки (ретроингибирование); *3* — репрессия образования ферментной системы. В квадрате — переработка информации

ствуют значительно более сложные механизмы регуляции, складывающиеся из систем с отрицательной и положительной обратной связью. Первые обеспечивают равновесие организма и составляющих его частей, вторые — нарастание событий и развитие всей системы.

Назначение каждого вида связи будет более подробно освещено в гл. IV, посвященной гормональной регуляции деления клеток. В настоящем же разделе будут разобраны два примера, иллюстрирующие действие систем с отрицательной обратной связью, расположенных на разных «этажах» организма.

В таких системах первый орган (или функция, или процесс) стимулирует второй, а второй угнетает первый. Этот вопрос детально разобран на примере регуляции работы многоферментных систем в клетке (Кафиани, 1962).

На рис. 5 буквами А—Д обозначены продукты реакций, буквой Ф с индексами 1—4 — ферменты, катализирующие реакции. Многие ферментные реакции тормозятся в силу специфического угнетения активности фермента непосредственным продуктом его действия (рис. 5, *1*). Такое продуктное угнетение носит характер простой отрицательной обратной связи. В целом ряде биохимических систем (например, в случае биосинтеза

нуклеотидов) используется другой путь регуляции по принципу отрицательной обратной связи, так называемое ретроингибирование (см. Umbarger, 1961), когда конечный продукт подавляет активность первого фермента цепи реакций (рис. 5, *2*); этот путь является биологически более выгодным, так как он исключает возможность ненужного образования и накопления соединений на каждом этапе реакций.

Однако и этот механизм не исчерпывает регуляционных потребностей клетки в отношении действия ферментных систем. Существует внутриклеточный механизм регуляции, когда действие конечного продукта распространяется на системы, от которых зависит синтез ферментов de novo, то есть на генетический аппарат клетки (подробно см. ниже), приводя к угнетению, или репрессии, образования всей ферментной системы (рис. 5, *3*). Если в первых двух случаях речь шла об изменении активности молекул фермента, то в последнем случае имеет место регуляция количества его молекул, иными словами, налицо иной уровень в иерархии регуляторных процессов.

Те же принципы регуляции осуществляются и в целом организме. На схеме регулирования уровня сахара в крови (см. рис. 4) видно, что инсулину, адреналину и кортикостероидам наряду с их специфическим действием на регулирующие органы принадлежит также важная роль в осуществлении тормозящего действия на центры промежуточного мозга и гипофиз (реафферентное воздействие).

Так, например, выделение гипофизом адренокортикотропного гормона (АКТГ), усиливающего образование кортикостероидов, зависит в свою очередь от их содержания в крови в каждый данный момент: понижение содержания этих гормонов вызывает повышение секреции АКТГ и наоборот. Таким образом, здесь имеет место типичный случай регуляции по типу отрицательной обратной связи, которая образует внутри общего контура регулирования свой малый замкнутый контур.

Характерно, что способностью к авторегуляции обладает не только вся описываемая система в целом, но и отдельные ее звенья, например печень, занимающая центральное место в углеводном обмене веществ.

По данным Соскина и Левина (Soskin a. Levine, 1952), в печени имеется собственный гомеостатический механизм, регулирующий поступление глюкозы в кровь независимо от инсулина или других гормонов. Последнее представляется особенно интересным в связи с тем, что в печени открыт еще один гомеостатический механизм (Glinos a. Gay, 1952; Glinos, 1958a, b, 1960; Stich, 1960), контролирующий деление клеток (см. также Bade a. Llanos, 1962; Туманишвили и Табидзе, 1962, 1963; Moya, 1963; Туманишвили, 1964а, б). Буллоу высказывает предположение, что в каждой ткани существует собственный гомеостатический

механизм, контролирующий режим митозов (Bullough a. Rytömaa, 1965).

В последние годы опубликованы многочисленные сборники, книги и отдельные статьи, посвященные различным аспектам применения кибернетики в решении биологических проблем (сборник статей немецких инженеров и биологов «Regelungsvorgänge in der Biologie», 1956; Ashby, 1956; Труды симпозиума в Теннесси (США) «Information theory in biology», 1957; Cassá, 1957; Ляпунов, 1958, 1963; Соболев и Ляпунов, 1958; сборник «Cellular regulatory mechanisms», 1961, из серии Cold Spring Harbor Symposia; сборник «Биологические аспекты кибернетики», М., 1962, и др.). Дальнейшее теоретическое развитие получила идея о приспособительном значении управляющих систем (Тимофеев-Ресовский и Ромпе, 1959; Малиновский, 1960; Шмальгаузен, 1964). Однако наиболее значительным успехом исследований в этой области явилось открытие внутриклеточных механизмов биологической авторегуляции некоторых обменных процессов.

Генетический контроль белкового синтеза. В последние годы большие успехи достигнуты в области изучения внутриклеточных механизмов регуляции белкового синтеза.

Согласно современным воззрениям, гены являются первичными факторами, определяющими белковый состав клетки (см. обзоры: Hogness, 1959; Хесин, 1961; Chantrenne, 1961; Баев, 1963; Спирин, 1965, и др.). Основным специфическим активным компонентом генов служит ДНК, главные функции которой заключаются в самовоспроизведении (репликации), а также в хранении и передаче генетической информации.

При репликации происходит синтез новых молекул ДНК на ДНК-матрице. Кроме того, на ДНК образуются молекулы информационной РНК, или и-РНК (процесс транскрипции), переносящей информацию от ДНК ядра к цитоплазматическим центрам синтеза белка — рибосомам (рис. 6). В цитоплазме происходит соединение активированных аминокислот с транспортными РНК (т-РНК), которые затем образуют комплекс с и-РНК рибосом (см. обзоры: Watson, 1963; Gierer, 1963; Киселев, 1963, 1964). Аминокислоты соединяются пептидной связью, и образовавшийся белок отделяется от рибосом. Взаимодействие и-РНК, т-РНК и рибосом при синтезе полипептидов получило название трансляции, или перевода генетической информации в структуру специфического белка. Таковы в самых общих чертах наиболее важные этапы белкового синтеза, каждый из которых может являться объектом воздействия.

ДНК играет в этом процессе роль программирующей матрицы, подчиняющейся в свою очередь сложной системе регуляции. Эта система была открыта и изучена Жакобом и Моно (Jacob a. Monod, 1961a, b, 1963) на примере индуцированного синтеза

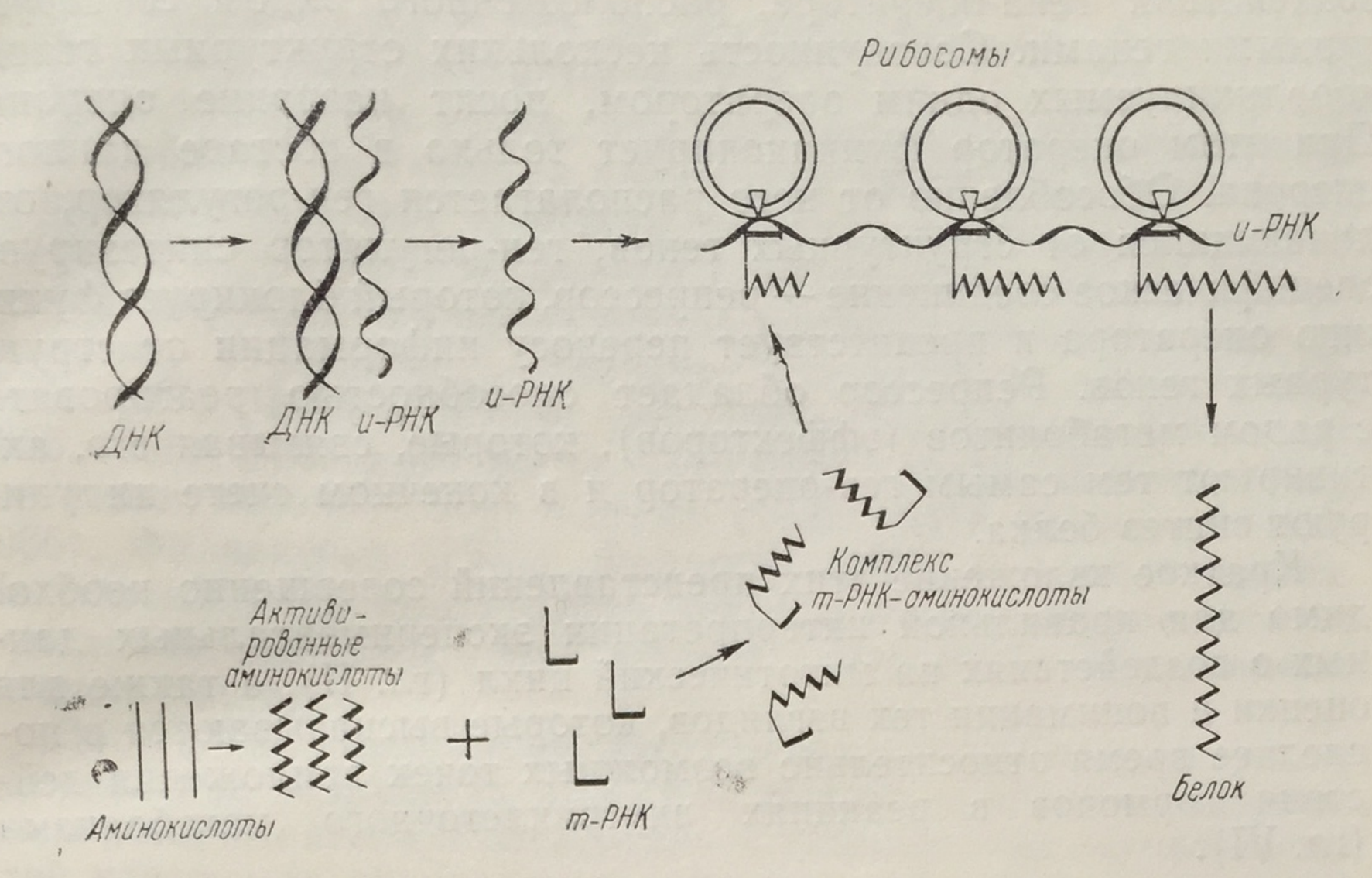


Рис. 6. Схема синтеза белка

ферментов у бактерий и в настоящее время широко используется при трактовке результатов, полученных на высших организмах, хотя общность процессов регуляции, по признанию самих авторов (Monod a. Jacob, 1961), не может считаться доказанной для различных ступеней развития живого мира.

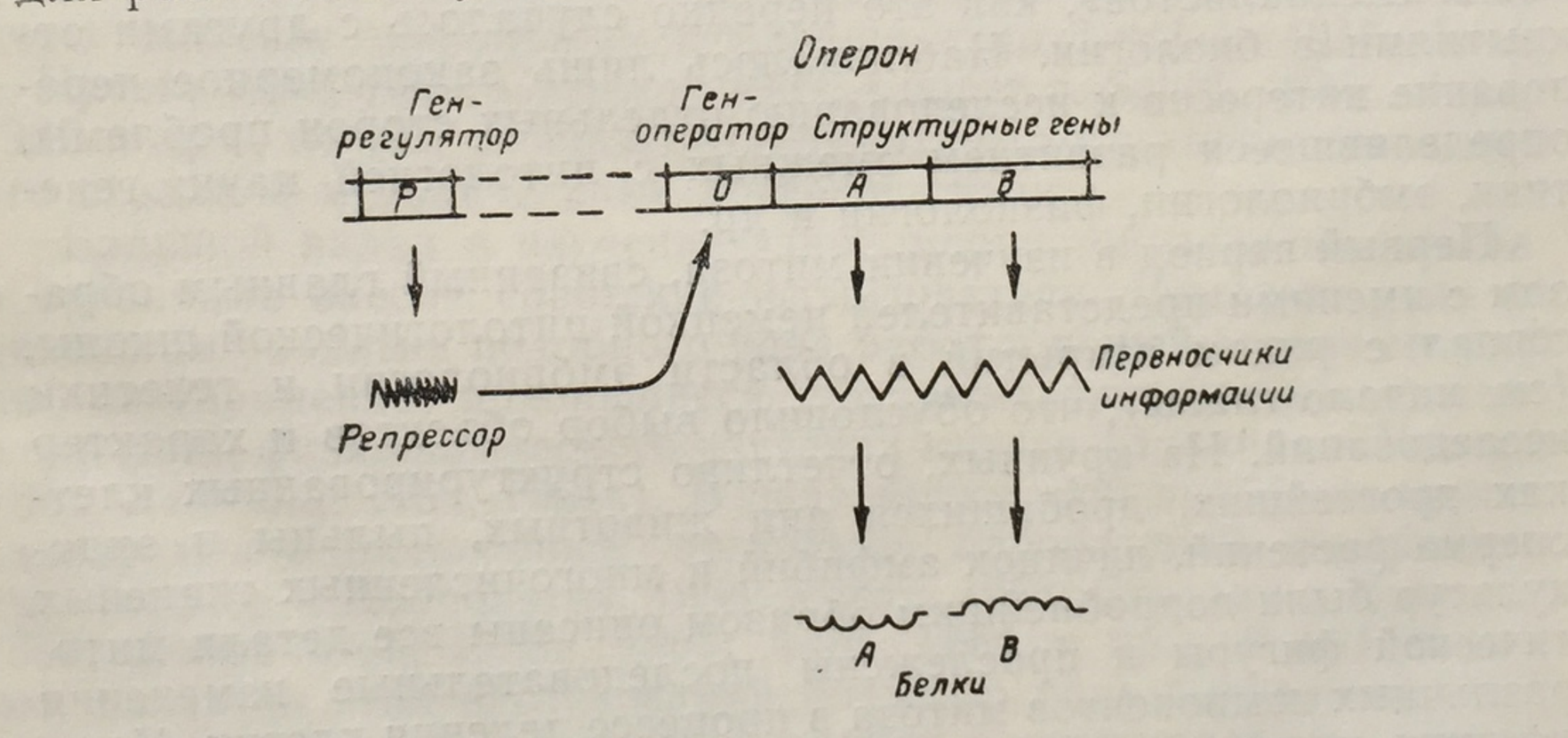


Рис. 7. Упрощенная схема регуляции синтеза белка по Жакобу и Моно (Jacob a. Monod, 1961)

Согласно схеме Жакоба и Моно (рис. 7), молекулярная структура синтезируемого белка определяется специальными структурными генами (участками ДНК), которые снабжают информацией и-РНК. Синтез и-РНК может начаться только при

воздействии гена-оператора, расположенного рядом со структурными генами. Совокупность нескольких структурных генов, координируемых одним оператором, носит название оперона. При этом оператор функционирует только в составе данного оперона. Обособленно от него располагается ген-регулятор, отличающийся от структурных генов; ген-регулятор синтезирует специфическое соединение — репрессор, который блокирует функцию оператора и препятствует переносу информации от структурных генов. Репрессор обладает способностью реагировать с рядом метаболитов (эффекторов), которые, связывая его, активируют тем самым ген-оператор и в конечном счете индуцируют синтез белка.

Краткое изложение этих представлений совершенно необходимо для правильной интерпретации экспериментальных данных о воздействиях на митотический цикл (гл. II), а также для оценки и понимания тех взглядов, которые высказываются в последнее время относительно возможных точек приложения действия гормонов в реакциях внутриклеточного метаболизма (гл. VI).

3. РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК. ПОНЯТИЕ О МИТОТИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ ОРГАНИЗМА

Митоз оказался счастливым открытием. Интерес к его изучению никогда не ослабевал, и ни разу на протяжении века он не становился, по выражению Гросса (Gross, 1960), «загадкой для касты специалистов», как это нередко случалось с другими открытиями в биологии. Наблюдалось лишь закономерное чередование интересов к исследованию отдельных сторон проблемы, определявшееся развитием смежных с цитологией наук: генетики, эмбриологии, физиологии и др.

Первый период в изучении митоза, связанный главным образом с именами представителей немецкой цитологической школы, совпал с рядом открытий в области эмбриологии и генетики (см. начало главы), что обусловило выбор объектов и характер исследований. На крупных, отчетливо структурированных клетках простейших, дробящихся яиц животных, пыльцы и эндосперма растений, личинок амфибий и многочисленных тканевых культур были подробнейшим образом описаны все детали митотической фигуры и прослежены последовательные изменения различных компонентов митоза в процессе деления клетки. Можно лишь удивляться точности наблюдений и выводов работ того времени, нашедших полное подтверждение в последующих исследованиях отдельных фаз митоза с помощью микрокиносъемки. Третье издание фундаментального труда Вильсона «Клетка» (Wilson, 1925) явилось своеобразным итогом этого плодотворного периода в истории изучения митоза, который продолжался

почти пятьдесят лет и без достижений которого не могла бы возникнуть и развиться цитогенетика.

Двадцатые и тридцатые годы ознаменовались большими успехами в области физиологии и биохимии. Особенный интерес стали привлекать к себе проблемы развития и поведения организма, роста и регенерации органов и тканей, действия желез внутренней секреции. Наступил период расцвета экспериментальной биологии, связанный с именами Гольдшмидта (Goldschmidt, 1920, 1927), Чайлда (Child, 1924, 1941), Пржибрама (Przibram, 1926, 1936), Вейсса (P. Weiss, 1930, 1939), Абело (Abeloos, 1932), а в нашей стране — Завадовского (1922, 1931), Кольцова (1927, 1936), Филипченко (1932), Филатова (1939) и многих других. На первый план выдвинулись вопросы регулирования, что не замедлило сказаться и на подходах к изучению митотического деления клеток.

Постепенно стало оформляться новое, физиологическое направление разработки проблемы митоза, основным содержанием которого стало исследование количественных закономерностей клеточного размножения в связи с его ролью в процессах обновления и развития организма.

Пионером этого направления по справедливости следует считать профессора факультета зоологии Лондонского университета Уильяма Сиднея Буллоу (W. S. Bullough, 1946 и др.) — автора многочисленных экспериментально-теоретических исследований и сводок по различным вопросам деления клеток, о которых будет идти речь впереди. Отдельные работы по количественному учету митозов появлялись и раньше (van Leyden, 1917; Loeb a. Haven, 1927, 1929; Carleton, 1934; Cooper a. Schiff, 1938; Lloyd, 1937 и др.), но они не носили систематического характера и часто страдали методическими погрешностями.

Большой вклад в изучение закономерностей деления клеток в организме внесли советские исследователи. Немалую роль в успешном развитии подобного рода работ в нашей стране сыграли своевременно появившиеся обзорно-теоретические статьи о значении физиологического изучения митоза (Залкинд и Уткин, 1951; Залкинд, 1952, 1954а). В разработку этой проблемы почти одновременно включилось несколько лабораторий (подробно см. Лиознер и Доброхотов, 1958; Уткин, 1958; Стрелин и Козлов, 1959; Доброхотов, 1959а, 1963; Алов, 1964, и др.). В интенсивном развитии этих исследований большую роль сыграло стремление к пониманию сущности и причин злокачественного роста тканей. Оценивая значение физиологического подхода к изучению митоза, Гейльбрун писал: «С точки зрения физиолога, одной из наиболее важных проблем клеточного деления является вопрос о факторах, вызывающих и задерживающих деление клетки, и эта проблема более непосредственно, чем все другие, связана с проблемой рака» (Heilbrunn, 1956, русск. перев., стр. 187).

Основной задачей исследований, проводимых в этом направлении, стало выяснение особенностей регуляции митотического деления в нормальном и патологически измененном организме.

Учитывая существующую иерархию регуляторных систем (см. предыдущий раздел), справедливо предполагать, что, изучая изменения процесса размножения клеток при воздействии на целый организм, исследователь в большинстве случаев сталкивается с проявлением различных модулирующих влияний, накладывающихся на более тонкие механизмы регуляции митоза, действующие на клеточном и молекулярном уровнях. По мнению Мэзия (Mazia, 1961a), проблема регуляции митотического деления в организме сводится в конечном итоге к изучению взаимодействия между различным образом устроенными клетками и системами, несущими в организме функцию передачи информации. Такой подход предполагает специфичность ответа в случае любого регулирующего воздействия. Вопрос о специфичности реакций на различных уровнях будет более подробно рассмотрен в гл. IV.

Важно также подчеркнуть, что при исследовании регуляции деления клеток в целом организме предметом изучения оказывается не индивидуальный акт митоза, а общие закономерности клеточного размножения в тканях. Это направление в изучении митоза было удачно названо Доброхотовым (1959a) гистофизиологическим, так как при любом воздействии на организм все клетки функционируют в составе тканей. Поэтому устанавливаемые в данном случае закономерности характеризуют клеточную популяцию в целом, то есть они являются преимущественно статистическими закономерностями (см. гл. IV).

Задачи и специфика гистофизиологического изучения деления клеток обусловили и выбор объектов исследования. Ими стали пролиферирующие ткани млекопитающих, на фиксированных препаратах которых можно было обнаружить относительно большое количество митозов, достаточное для получения необходимых показателей и последующей статистической обработки материала. Удобными объектами в этом отношении оказались эпителий роговицы, эпителий крипт кишечника, эпидермис и некоторые другие ткани, число которых со временем возросло.

В процессе исследований выяснилось, что каждой ткани присущ определенный уровень митотической активности. О митотической активности обычно судят на основании вычисления митотического коэффициента, или митотического индекса, под которым понимают отношение числа митозов к общему числу клеток ткани; менее точным показателем митотической активности является число митозов на единицу площади или объема ткани.

Существование в организме тканей с самым различным уровнем митотической активности, который может закономерно изменяться под влиянием внешних и внутренних факторов, привело к представлению о митотическом режиме организма (см. Доброхотов, 1959а).

Оказалось, что изменения митотической активности в большинстве органов и тканей носят четко выраженный ритмический характер. Была обнаружена суточная и сезонная периодичность числа митозов в тканях, а также периодичность, связанная с половыми циклами. Выяснилась тесная зависимость митотической активности отдельных органов от их функционального состояния, в частности от режима питания.

Большой интерес вызвал установленный в разных опытах факт огромной лабильности уровня митотической активности некоторых органов по отношению к самым, казалось бы, незначительным изменениям внешних условий. Эти наблюдения стимулировали большое количество работ по изучению нервных и гормональных влияний на митотический режим организма.

Были получены новые данные о роли клеточного деления в репаративной и физиологической регенерации органов, позволившие пересмотреть прежние представления об их способности к восстановлению.

Наконец, были изучены закономерности деления клеток в тканях организма при развитии опухолей и в самих опухолях, а также митотический режим тканей при облучении и других воздействиях (см. Уткин, 1958; W. S. Bullough, 1962a; Bertalanffy a. Lau, 1962, 1963; Доброхотов, 1963; Алов, 1964, и др.).

Не затрагивая многих интересных и важных вопросов регуляции митотического режима организма, подробно изложенных в вышеупомянутых трудах, мы перейдем к рассмотрению литературы, посвященной регуляции митотического цикла.

Глава II

РЕГУЛЯЦИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

1. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МИТОТИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ И ЕГО ПЕРИОДАХ

Понятие о митотическом цикле существовало уже давно, однако точное определение его отсутствовало. Поскольку основным объектом изучения митотического деления обычно служили синхронно дробящиеся яйца с быстро протекающими митозами, где вслед за телофазой почти сразу же начинается профаза, митотический цикл нередко отождествляли с самим митозом. Лишь позднее в это понятие стали включать и интерфазу (A. Hughes, 1952), рассматривая ее как подготовительный период в целом.

Первая успешная попытка расчленить интерфазу принадлежит Говард и Пелку (Howard a. Pelc, 1951a, b), показавшим методом радиоавтографии (см. гл. VIII), что включение P^{32} в ДНК клеток корня конского боба Vicia faba происходит только в интерфазе, заканчиваясь за несколько часов до начала митоза.

В следующей работе этих же авторов (Howard a. Pelc, 1953) указанный феномен был подвергнут более детальному исследованию. Корешки выдерживали в среде, содержавшей P^{32}, в течение 1 часа, а затем переносили их в среду с нерадиоактивным фосфором и фиксировали через каждый час. Для удаления меченой РНК препараты обрабатывали рибонуклеазой. Первые меченые митозы (профазы) можно было обнаружить только через 8 час. после контакта корешков с радиоактивным фосфором, из чего был сделан вывод о прекращении синтеза ДНК за 8 час. до начала митоза.

Через 6 час. после появления первых меченых митозов снова начали преобладать немеченые митозы, что свидетельствовало о локализации синтеза ДНК в течение определенного периода интерфазы, равного 6 час. Авторам удалось проследить появление второго максимума меченых митозов — через 30 час. после первого; следовательно, весь митотический цикл клеток корня Vicia faba, включая митоз и интерфазу, продолжался 30 час.

Говард и Пелк предложили разбить митотический цикл на четыре периода (рис. 8): собственно митоз, пресинтетический пе-

риод (G_1) [1], период синтеза ДНК (S) и премитотический период (G_2).

Несмотря на четкость полученных результатов и успешное воспроизведение их на других объектах (Lajtha et al., 1954; Hornsey a. Howard, 1956), значение данных Говард и Пелка было

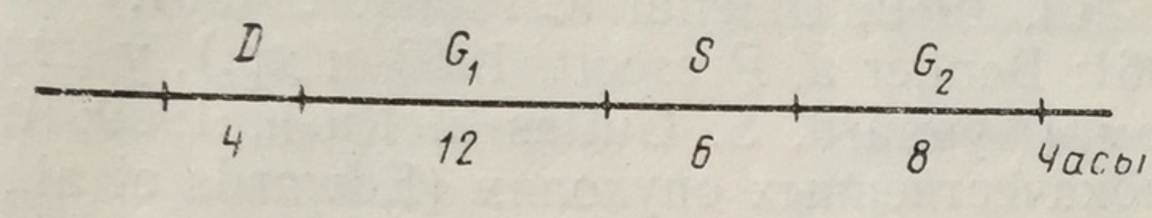


Рис. 8. Первая схема митотического цикла с разделением интерфазы на отдельные периоды (Howard a. Pelc, 1953)

D — деление клетки (митоз); G_1 — пресинтетический период; S — период синтеза ДНК; G_2 — премитотический период

оценено лишь позднее, когда они нашли подтверждение в более точных исследованиях с использованием меченых предшественников ДНК. В течение же нескольких лет высказывались самые разнообразные суждения о времени синтеза ДНК в митотическом цикле (Swift, 1950, 1953; Pasteels et Lison, 1950; P. M. B. Walker a. Jates, 1952; Stevens, Daoust a. Leblond, 1953; P. M. B. Walker, 1954; Daoust a. Lamirande, 1955; P. M. B. Walker a. Mitchison, 1957; Cavalli, 1958, и др.) и предлагались различные схемы митотического цикла, не нашедшие в дальнейшем подтверждения (см. например, G. B. Wilson a. Morrison, 1959, и др.).

Более углубленному изучению митотических циклов способствовало успешное применение в радиоавтографических исследованиях соединений, меченных тритием (см. гл. VIII), а также фундаментальные открытия в области строения и функции ДНК как реплицирующейся матрицы (Watson a. Crick, 1953a, b). Были получены данные об относительной метаболической стабильности ДНК (Kihara a. Sibatani, 1955) и показано, что вновь образующаяся ДНК переходит в дочерние клетки, почти не претерпевая изменений (Healy et al., 1956).

Следующим шагом было использование в радиоавтографии специфического предшественника ДНК — тимидина, меченного тритием, что позволило избирательно метить клетки в периоде синтеза ДНК и прослеживать судьбу меченых клеток и отдельных хромосом в нескольких генерациях (J. H. Taylor, Woods a. Hughes, 1957; W. L. Hughes, Bond et al., 1958, и др.).

За сравнительно короткое время были получены многочисленные данные о продолжительности митотических циклов и их периодов в тканях животных (Quastler a. Sherman, 1959; Cattaneo et al., 1961; Sherman et al., 1961; Lesher et al., 1961; Maloney et

[1] От английского gap — интервал.

al., 1961; Жинкин и Андреева, 1962, 1963а; Чумак, 1963б; Зосимовская, 1963, 1964а; Хрущов, 1963, и др.), растений (Wimber, 1960; Clowes, 1961; Woodard et al., 1961; Van't Hof, 1963, и др.), в культурах клеток (Firket a. Verly, 1958; Painter a. Drew, 1959; Cronkite et al., 1959; J. H. Taylor, 1960a; Harrington, 1960, 1961; Stanners a. Till, 1960; Defendi a. Manson, 1961, 1963; Sisken a. Kinosita, 1961; Bender a. Prescott, 1962, и др.), у низкоорганизованных форм (Nygaard, S. Guttes a. Rush, 1960; Wanka, 1962, и др.), в злокачественных опухолях (Edwards et al., 1960; Mendelsohn et al., 1960; Oehlert, Lauf u. Seemayer, 1962; Baserga, 1963; Франкфурт и др., 1963, и др.). Более подробные сведения по этому вопросу содержатся в обзорах Зосимовской (1962а) и Чумак (1963а).

2. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОХОЖДЕНИЯ КЛЕТКАМИ ПЕРИОДОВ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Результаты интенсивно развивающихся радиоавтографических исследований в совокупности с данными цитологии и биохимии, получаемыми в опытах на синхронизированных и естественно синхронных объектах (см. обзор Ломакиной, 1963), позволяют наметить некоторые общие закономерности прохождения клетками митотического цикла.

Под митотическим циклом в настоящее время понимают совокупность взаимосвязанных и детерминированных хронологически событий, происходящих в клетке в период подготовки к делению, а также на протяжении самого митоза (см. Mazia, 1960a и др.; Chèvremont, 1960). Началом митотического цикла Цанев и Марков (1964а) предлагают считать тот момент, когда в морфологически еще не измененной клетке начинается биохимическая подготовка клеточного деления, а окончанием цикла — завершение в двух дочерних клетках всех процессов, связанных с делением. В том случае, если очередной митотический цикл начинается сразу же после окончания предыдущего (как это бывает в быстро размножающихся клеточных популяциях, находящихся в так называемой логарифмической фазе роста), он совпадает со всем периодом существования клетки, то есть с ее жизненным циклом (отсюда — частое употребление этих понятий в качестве синонимов).

Однако в сформированном многоклеточном организме часть клеток по окончании митотического цикла подвергается дифференцировке и начинает выполнять ту или иную специфическую функцию, связанную с синтезом определенных специфических белков и не совместимую с процессами подготовки к делению. Недавно было показано (Жинкин и Андреева, 1963б), что разрушение дифференцированных мышечных волокон, приводящее к распаду сократимой субстанции, делает клетки способными к

синтезу ДНК и дальнейшему прохождению митотического цикла. Следовательно, тот период жизни клетки, когда она выполняет специфическую функцию, находясь в дифференцированном состоянии, нельзя отнести к митотическому циклу, и жизненный цикл клеток в сформированном организме может быть значительно больше их митотического цикла. Эти соотношения представлены на рис. 46 (гл. VIII); обычно же митотический цикл изображают в виде круга с указанием периодов в соответствии с обозначениями, предложенными Говард и Пелком (рис. 9).

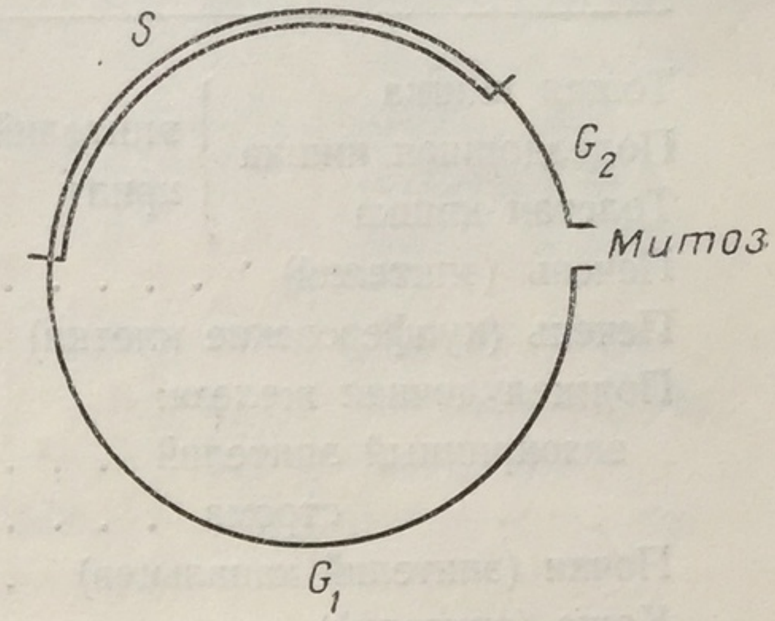


Рис. 9. Схема митотического цикла

G_1— пресинтетический (постмитотический) период; S — период синтеза ДНК; G_2— премитотический (постсинтетический период)

Все события митотического цикла находятся между собой в определенных соотношениях, которые в настоящее время изучаются в разных аспектах.

Продолжительность митотического цикла (иначе — время генерации) составляет у млекопитающих чаще всего 18—24 часа (см. обзор Чумак, 1963а). Однако необходимо отметить значительную вариабельность в длительности митотических циклов отдельных клеток. Так, по данным Чумак (1963в), полученным методом радиоавтографии, продолжительность митотического цикла в эпителии роговицы мыши составляет около 72 час., а в эпителии двенадцатиперстной кишки того же животного — 11 час. В то же время продолжительность S-периода в этих тканях различается менее чем в два раза (она равна соответственно 8,5 и 4,5 час.).

Вопрос о постоянстве в митотическом цикле времени синтеза ДНК постоянно поднимается в экспериментальных исследованиях (см. Cameron, 1964, и др.). Пильгрим и Маурер (Pilgrim u. Maurer, 1962) определили продолжительность S-периода в различных тканях одного и того же животного (мыши) и пришли к заключению, что она колеблется незначительно, составляя для большинства тканей 7—8 час. (табл. 1). Впоследствии эти данные были подтверждены авторами на большем материале (Pilgrim u. Maurer, 1965).

Постоянство времени S-периода (7—8 час.) обнаружено в эпителии различных отделов пищеварительного тракта мыши в нормальных условиях (Cameron a. Greulich, 1963) и после частичной резекции кишечника (Loran a. Crocker, 1963), в различных зонах коры надпочечников крыс (Ford a. Young, 1963), в остеогенной ткани (Owen a. McPherson, 1963), при канцерогенезе в эпидермисе (Dörmer et al., 1964). Интересно, что такой же

Таблица 1

Время удвоения количества ДНК в различных тканях мыши
(Pilgrim u. Maurer, 1962)

Ткань	Продолжительность S-периода, часы*	
	H^3—C^{14}	H^3—H^3
Тощая кишка, Подвздошная кишка, Толстая кишка — эпителий крипт	7,9	7,4
	8,5	6,5
Печень (эпителий)		7,0
Печень (купферовские клетки)	8,2	7,3
Поджелудочная железа:		
экзокринный эпителий	8,5	7,7
строма		6,5
Почки (эпителий канальцев)	6,6	7,6
Кожа (эпителий)	7,1	
Пищевод (эпителий)	6,1	5,2
Преджелудок (эпителий)	9,1	7,0
Желудок (эпителий)	9,0	6,3
Легкие (эпителий альвеол)	7,5	7,5
Воспалительные клетки (пневмония)		6,3
Лимфатические узлы кишечника	8,4	7,6

* Приведенные результаты получены методом «двойной метки»: цифры левого столбца — с помощью двух разных изотопов, правого столбца — посредством разных концентраций одного изотопа.

относительной стабильностью в митотическом цикле тканей сформированного организма характеризуется и время митоза, как это в свое время было неоднократно показано в опытах с воздействием колхицином и другими агентами (см. W. S. Bullough, 1952c; Swann, 1957; Уткин, 1958). В тканях млекопитающих митоз обычно длится в пределах 1 часа. Признание постоянства времени митоза не следует, разумеется, понимать как утверждение абсолютной невозможности воздействия на ход уже начавшегося деления.

В противоположность этому длительность периодов G_1 и G_2 подвержена значительно большим колебаниям. В первую очередь это относится к пресинтетическому периоду G_1, продолжительность которого варьирует в различных тканях от нулевого значения до многих часов и даже дней (табл. 2).

Данные о постоянстве времени S-периода и митоза первоначально привели к предположению о постоянстве всего периода удвоения (редупликации) клеточных структур в митотическом

Таблица 2

Продолжительность периодов G_1 и G_2 в некоторых тканях мыши

Ткани		Время, часы		Автор
нормальные	опухолевые	G_1	G_2	
	Опухоль Эрлиха	0,0	6,0	Hornsey a. Howard, 1956
		3,0	1,5	Edwards et al., 1960
		0,0	2,0	Baserga, 1963
		4,6	6,0	Франкфурт, 1964
Эпителий подвздошной кишки		9,5	1,5	Quastler a. Sherman, 1959
Эпителий двенадцатиперстной кишки		4,5	1,0	Lesher et al., 1961
Эпителий волосяных фолликулов		3,0	1,0	Cattaneo et al., 1961
Эпителий роговицы		60,0	4,0	Чумак, 1963б
Эпидермис уха		528,0	6,0	Sherman et al., 1961

цикле — $S+G_2+$ митоз (см. Sisken a. Kinosita, 1961). Этот взгляд находил подтверждение в тех работах, где были получены сходные между собой значения продолжительности периода G_2 ($\sim$1 час) для разных тканей (Quastler a. Sherman, 1959; Cattaneo et al., 1961; Lesher et al., 1961, и др.). Однако постепенно стали накапливаться сведения о различной продолжительности периода G_2 (табл. 2). Была показана возможность длительной задержки клеток в этом периоде при неблагоприятных воздействиях (Yamada a. Puck, 1961; Веселкина, 1962, и др.).

По данным Гелфанта (Gelfant, 1962, 1963в), в эпидермисе уха мыши имеется две популяции клеток с различной продолжительностью периода G_2: менее шести часов и более двух дней, а по последним результатам (Gelfant, 1963с) — более пяти (!) дней. Сходная картина обнаружена в ткани эмбриональной поджелудочной железы мыши (Wessels, 1964).

Хотя вопрос этот и является в настоящее время предметом дискуссии (Hell, 1963; Hell a. Cruickshank, 1963), имеющиеся данные позволяют сделать вывод о значительно большей лабильности периодов G_1 и G_2, чем S-периода и митоза (см. также Wolfsberg, 1964; Odartchenko et al., 1964).

Все сказанное заставляет предполагать, что контроль за событиями митотического цикла осуществляется не на всех, а лишь на определенных его этапах, и что факторы, регулирующие синтез ДНК и митоз в цикле, по-видимому, различны.

Действительно, как уже было сказано, окончание митоза само по себе еще не означает, что клетка будет снова синтезировать ДНК. Точно так же и окончание синтеза ДНК после удвоения ее количества не является достаточным условием следующего деления. В многоядерном синхронно делящемся плазмодии Physarum

polycephalum синтез ДНК начинается почти сразу же после митоза и заканчивается через 1—2 часа, а в следующий митоз клетки вступают лишь 15 час. спустя (Nygaard et al., 1960).

Применяя ингибиторы отдельных этапов синтеза ДНК, Ларк (Lark, 1960, 1963) на синхронизированной культуре Alcaligenes faecalis сумел экспериментально отделить цикл редупликации ДНК от цикла деления клеток. Он показал, что время синтеза ДНК подчинено своему собственному «расписанию», которое не связано с количеством ДНК в клетке. На существование внутриклеточного механизма регуляции синтеза ДНК, не зависящего от содержания последней в ядре, указывают и другие исследователи (Cameron a. Stone, 1964). Диссоциацию клеточного деления и синтеза ДНК в синхронизированной культуре Tetrahymena pyriformis получил Цейтен (Zeuthen, 1963), который также пришел к заключению, что оба эти процесса контролируются различными механизмами.

Однако в условиях митотического цикла синтез ДНК и митоз оказываются связанными между собой, так как синтез ДНК лимитирует вступление клеток в митоз. Нормальная соматическая диплоидная клетка не может разделиться, не удвоив содержания ДНК. Цикличность событий определяет и обратную зависимость синтеза ДНК от митоза. Если задержать клетки на длительное время в каком-либо периоде цикла, например в митозе, то рано или поздно это отразится и на синтезе ДНК, так как постепенно будет уменьшаться число клеток, вступающих в *S*-период.

Следствием подобного рода зависимости является то, что факторы, регулирующие синтез ДНК в клетке, могут контролировать также и вступление клеток в митоз и в конечном счете определять пролиферативную активность клеточной популяции. Поэтому механизмы, обусловливающие переход клетки к синтезу ДНК, как и механизмы самого митоза, можно считать пусковыми механизмами митотического цикла.

Такое представление предполагает возможность экспериментального изучения закономерностей митотического деления путем исследования нарушений, возникающих под влиянием различных факторов на протяжении всего митотического цикла.

3. ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛАХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ. ОБРАЗОВАНИЕ БЛОКОВ

Исследования подобного рода проводятся в двух направлениях:

1. Выявляются точки приложения действия изучаемых факторов, то есть устанавливаются вызываемые ими нарушения в митотических циклах и определяется чувствительность отдельных периодов цикла к данному воздействию.

2. Применяемое воздействие используется как своего рода аналитический инструмент, позволяющий устанавливать общие закономерности прохождения клетками периодов митотического цикла.

К числу наиболее часто используемых в этом плане воздействий относится облучение клеток различными видами ионизирующей радиации (см. ниже), а также ультрафиолетовым светом (Whitfield et al., 1961; Powell, 1962a, b; Humphrey, Dewey a. Cork, 1963, и др.). Благодаря сочетанию радиоавтографического и биохимического методов изучения действия радиации на митотические циклы различных тканей с параллельным анализом хромосомных аберраций и деструкций клеток, за последнее время получено большое количество данных о неодинаковой чувствительности к облучению клеток, находящихся в разных периодах митотического цикла, и высказаны гипотезы о причинах наблюдаемых различий. Подробное изложение этих материалов, составляющих одну из новых глав радиобиологии, содержится в специальных обзорах (Lajtha, 1960; Nygaard, 1962; Quastler, 1963a b; Patt a. Quastler, 1963), а также в отдельных статьях (Sherman a. Quastler, 1960; Harrington, 1960, 1961; Whitmore et al., 1961; Till, 1961; Yamada a. Puck, 1961; Terasima a. Tolmach, 1961, 1963a, b; Dewey a. Humphrey, 1962, 1963, 1964; Дубинин и Дубинина, 1963а, б; Чумак, 1963в; Dewey, Humphrey a. Cork, 1963; Mak a. Till, 1963, и др.).

Наряду с этим в процессе исследования действия облучения на прохождение клетками митотического цикла был выявлен характерный феномен так называемого б л о к и р о в а н и я перехода клеток от одного периода цикла к другому, представляющий собой временную задержку клеток на определенном этапе цикла с последующим вступлением в очередной этап одновременно большого количества клеток (рис. 10).

Блок $G_1 — S$. В результате действия ионизирующего излучения на корень Vicia faba (Howard a. Pelc, 1953; Pelc a. Howard, 1955) было обнаружено торможение перехода клеток из пресинтетического периода G_1 в период синтеза ДНК. Этот же феномен (блок $G_1 — S$, или G_1-эффект, как назвал его Лайта) был выявлен при облучении клеток костного мозга (Lajtha et al., 1958) и эпителия кишечника (Sherman a. Quastler, 1960). Блок $G_1 — S$ не специфичен для действия радиации. Блокировать вступление клеток в S-период можно с помощью ингибиторов отдельных звеньев биосинтеза ДНК. На этом принципе основан ряд химических способов синхронизации клеток в культуре (Lark, 1960; Rueckert a. Mueller, 1960; E. W. Taylor, 1961; Xeros, 1962, и др.). Возникновение блока $G_1 — S$ в митотическом цикле опухоли Эрлиха при введении мышам амбунола (ингибитора реакций, осуществляемых при взаимодействии свободных радикалов), было установлено в работе Франкфурта и др. (1963).

Блок G_2— M. У облученных культур клеток HeLa (Painter a. Robertson, 1959; Yamada a. Puck, 1961, и др.), фибробластов линии *L* (Whitfield a. Rixon, 1959; Whitmore et al., 1961, и др.) и *U*-12 (Harrington, 1960, 1961) было установлено возникновение блока при переходе от премитотического периода G_2 к митозу

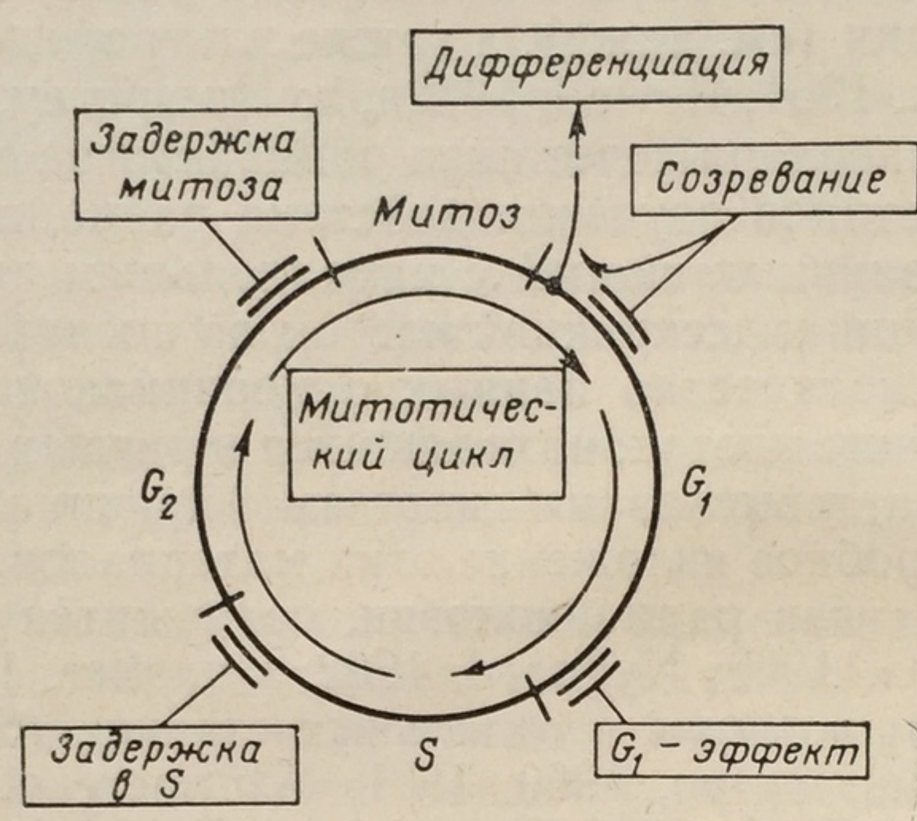


Рис. 10. Схема, иллюстрирующая возникновение блоков на различных этапах митотического цикла (Quastler, 1963a)
Обозначения те же, что на рис. 9 и 10

(блок $G_2 — M$, или G_2-эффект). В дальнейшем было показано, что оба блока ($G_1 — S$ и $G_2 — M$) могут возникать при облучении независимо друг от друга (Веселкина, 1962; Зосимовская, 1962б, 1964б; Чумак, 1962, 1963в; Terasima a. Tolmach, 1963a, b; Mak a. Till, 1963; Грачева, 1964, и др.). При этом блок $G_2 — M$ отражает не что иное, как хорошо известный феномен быстрого («реактивного») снижения числа митозов при облучении и других воздействиях (см. Стрелин, 1956; Уткин, 1958, и др.). Этот блок может возникать при действии на организм стрессоров самой различной природы (см. гл. III, раздел 2), аналогов иприта (Layde a. Baserga, 1964) и, как правило, является кратковременным. В одних и тех же условиях блок $G_1 — S$ оказывается глубже и продолжительнее, чем блок $G_2 — M$ (Зосимовская, 1962б, 1964б; Чумак, 1963в).

S-эффект и блок $S — G_2$. При действии радиации значительно снижается интенсивность синтеза ДНК в *S*-периоде (так называемый *S*-эффект), хотя полного прекращения его не наступает (см. Lajtha, 1960). Очевидно, это связано с асинхронностью синтеза ДНК в различных хромосомах и в отдельных участках хромосом (Прокофьева-Бельговская, 1947; J. H. Taylor, 1958, 1960b, 1962, 1963; German, 1962, 1964; Gilbert et al., 1962; Moorhead a. Defendi, 1963; Lajtha, 1963, и др.), благодаря чему ядро остается

Блок G_2— *М*. У облученных культур клеток HeLa (Painter a Robertson, 1959; Yamada a. Puck, 1961, и др.), фибробластов ли нии *L* (Whitfield a. Rixon, 1959; Whitmore et al., 1961, и др.) *U*-12 (Harrington, 1960, 1961) было установлено возникновени блока при переходе от премитотического периода G_2 к митоз

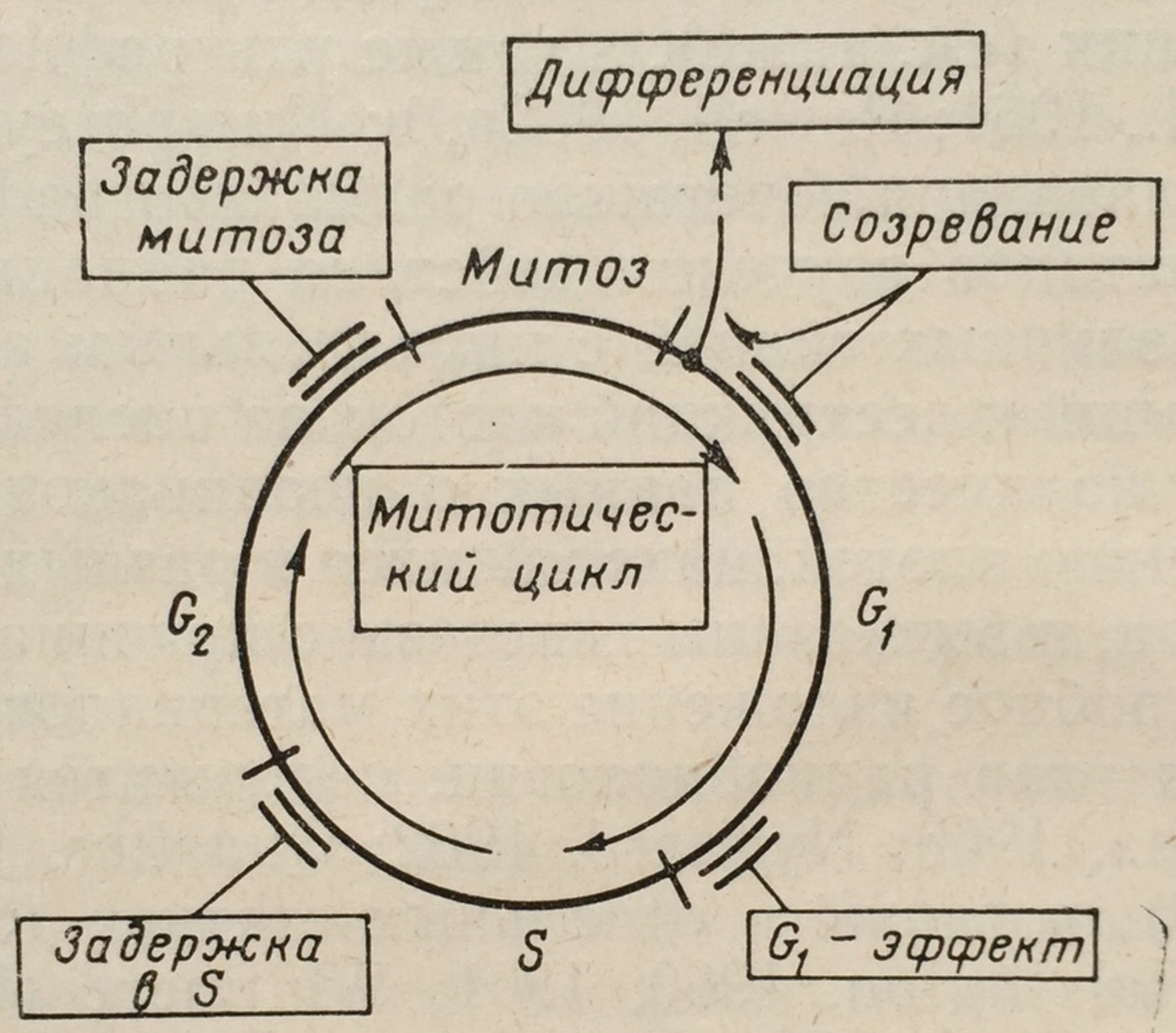


Рис. 10. Схема, иллюстрирующая возникновение блоков на различных этапах митотического цикла (Quastler, 1963a)

Обозначения те же, что на рис. 9 и 10

(блок $G_2 — M$, или G_2-эффект). В дальнейшем было показано, что оба блока ($G_1 — S$ и $G_2 — M$) могут возникать при облучении независимо друг от друга (Веселкина, 1962; Зосимовская, 1962б, 1964б; Чумак, 1962, 1963в; Terasima a. Tolmach, 1963a, b; Mak a. Till, 1963; Грачева, 1964, и др.). При этом блок $G_2 — M$ отражает не что иное, как хорошо известный феномен быстрого («реактивного») снижения числа митозов при облучении и других воздействиях (см. Стрелин, 1956; Уткин, 1958, и др.). Этот блок может возникать при действии на организм стрессоров самой различной природы (см. гл. III, раздел 2), аналогов иприта (Layde a. Baserga, 1964) и, как правило, является кратковременным. В одних и тех же условиях блок $G_1 — S$ оказывается глубже и про-

метаболически активным на протяжении всей интерфазы. Помимо облучения, S-эффект был получен при воздействиях канцерогенами на различные ткани (McCarter a. Quastler, 1962a, b; Evensen, 1962a, b; Evensen a. Iversen, 1962; Jensen et al., 1963; Iversen, 1964), а также при действии сарколизина на асцитную опухоль Эрлиха (Франкфурт, 1963, 1964). Принцип воздействия на S-период положен в основу некоторых способов температурной синхронизации клеток (см. обзор Ломакиной, 1963).

Если при действии радиации клетки продолжают синтезировать ДНК, но не могут закончить синтез и перейти к последнему этапу подготовки к митозу, это указывает на возникновение блока $S - G_2$ (см. Quastler, 1963a). Обнаружить этот блок удалось впервые Пейнтеру и Робертсону (Painter a. Robertson, 1959), наблюдавшим увеличение количества клеток, синтезирующих ДНК, через 4—8 час. после облучения культуры HeLa в дозе 500 p, что они объясняют длительной задержкой клеток в S-периоде. Однако убедительное доказательство существования блока $S - G_2$ было представлено лишь недавно в работе Мака и Тилла (Mak a. Till, 1963), которые, применив остроумный методический прием — «двойную метку» (воздействие на клетки сначала слабым, а затем концентрированным раствором H^3-тимидина, что позволяет различать клетки первого и второго типа по числу зерен серебра),— показали, что после облучения культуры L-клеток снижается интенсивность синтеза ДНК и клетки в течение некоторого времени не переходят из S-периода в период G_2.

Недавно было показано (Palme et al., 1964), что последовательное образование блоков G_2—M и S—G_2 в митотическом цикле эпителия тонкого кишечника можно наблюдать при введении мышам различных доз циклофосфамида (эндоксана).

4. КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Понятие о критических периодах и их экспериментальное выявление. То обстоятельство, что под влиянием различных факторов поражаются одни и те же этапы митотического цикла, постепенно привело исследователей к мысли о существовании в митотическом цикле определенных критических периодов (состояний), характеризующихся повышенной чувствительностью к воздействиям. Уже в течение нескольких лет предпринимаются упорные попытки выделить в митотическом цикле наиболее важные события, определяющие дальнейший ход процесса.

Критический период, предшествующий делению клетки. Представление об «энергетическом резервуаре». Начало экспериментальному изучению критических периодов митотического цикла [2]

[2] Эти периоды не следует смешивать с периодами G_1, S и G_2.

было положено работами Суонна (Swann, 1953, 1954a, 1955) по воздействию ингибиторами дыхания на синхронно делящиеся яйца морского ежа Psammechinus miliaris. Суонн показал, что если ингибитор действует в определенный период, предшествующий митозу, то ближайшее деление будет задержано ровно настолько, сколько времени продолжалось действие ингибитора. Если же применять ингибитор перед самым началом или во время митоза, то последний протекает как обычно, но следующее деление вновь задерживается на отрезок времени, равный времени действия ингибитора. Таким образом, было обнаружено существование перед митозом определенного критического периода (термин, принадлежащий Суонну), пройдя который, клетки теряли чувствительность к факторам, воздействовавшим на предыдущий этап цикла.

Проведенные опыты привели Суонна к заключению, подтверждавшему более ранние наблюдения Буллоу (W. S. Bullough, 1952c), что клетка запасает энергию, необходимую для протекания митоза, в виде макроэргических соединений (преимущественно АТФ) до начала деления и что сам митоз не зависит от процессов дыхания или гликолиза. Так возникло представление об «энергетическом резервуаре» клетки (Swann, 1953, 1957), поддержанное многими исследователями (см. Mazia, 1961a; W. S. Bullough, 1962a, и др.). Однако в последнее время стали появляться данные (Amoore, 1961a, b; 1962a, b, 1963), показывающие, что нечувствительность митоза к отсутствию кислорода и АТФ не является абсолютной. Было найдено (Epel, 1963), что митозы в дробящихся яйцах морского ежа могут быть блокированы практически в любой точке, если применять ингибитор за определенное время до наступления данной стадии. Авторы этих работ предлагают пересмотреть концепцию об «энергетическом резервуаре» (см. также Mazia, 1963).

Независимо от того, как будут развиваться эти исследования, мысль Суонна о существовании критического периода в митотическом цикле следует считать весьма перспективной.

В опытах на синхронизированной культуре Tetrahymena pyriformis Хамбургер и Цейтен (Hamburger a. Zeuthen, 1957) обнаружили перед началом деления макронуклеуса критический период, в течение которого нарастала чувствительность к динитрофенолу (ДНФ). Голдэн и Перри (Gaulden a. Perry, 1958) выявили критический период в ранней профазе митоза в нейробластах кузнечика, пройдя который, ядрышко теряло чувствительность к облучению микропучком ультрафиолетовых лучей. Позднее на этом же объекте было показано (McGrath et al., 1965), что в поздней профазе имеется еще один критический период, по прошествии которого клетки утрачивают способность к дополнительному синтезу ДНК, вызываемому облучением.

«Пункты необратимости». Основываясь на подобных данных и на результатах собственных исследований по динамике функционирования митотического аппарата дробящихся яиц иглокожих (Went a. Mazia, 1959; Went, 1959a, b, 1960; Mazia et al., 1960; Bucher a. Mazia, 1960), Мэзия выдвинул представление о существовании в митотическом цикле так называемых пунктов необратимости («points of no return»), разделяющих этапы цикла, различные по своей чувствительности к действию контролирующих факторов (Mazia, 1961a). Если переход клетки к какому-либо этапу цикла может быть предотвращен до известного момента, но уже не поддается блокированию после этого момента, то пункт необратимости, по мнению Мэзия, может считаться установленным.

Критический период, предшествующий синтезу ДНК. Естественно, что исследования в этом направлении не могли ограничиться экспериментами на дробящихся яйцеклетках, обладающих слишком короткой интерфазой, которая существенно отличается от периода подготовки к митозу в клетках сформированного организма (Sentein, 1962; Mazia, 1963).

После опубликования работ Фридкина и Корнберга (Friedkin a. Kornberg, 1957; Friedkin, 1959) о ключевой роли синтеза тимидиловой кислоты (ТМФ) в реакциях, предшествующих биосинтезу ДНК, внимание исследователей было привлечено к изучению этих процессов в связи с размножением клеток.

Еще раньше в лаборатории Корнберга было показано (Kornberg et al., 1956), что для синтеза ДНК в клетке необходимо присутствие всех четырех нуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, ЦТФ и ТТФ), входящих в состав молекулы ДНК (рис. 11). Из четырех нуклеозидмонофосфатов (АМФ, ГМФ, ЦМФ и ТМФ), подвергающихся фосфорилированию при участии соответствующих киназ, только тимидиловая кислота отсутствует в тканях в виде свободного метаболита и должна быть синтезирована путем метилирования дезоксиуридинмонофосфата в присутствии тетрагидрофолиевой кислоты (так называемый «метиловый шунт» по Фридкину) с помощью фермента тимидилатсинтетазы. Только после метилирования д-УМФ в ТМФ тимидилаткиназа может катализировать фосфорилирование до ТТФ (Friedkin a. Kornberg, 1957).

Таким образом, было установлено, что реакции образования и фосфорилирования ТМФ в клетке могут лимитировать ход синтеза ДНК.

В ходе дальнейших исследований была обнаружена высокая активность тимидинкиназы и тимидилаткиназы в быстро пролиферирующих тканях, таких, как регенерирующая печень млекопитающих и другие объекты. В то же время было показано, что киназы остальных дезоксирибонуклеотидов (аденина, гуанина и цитидина) содержатся в нормальных регенерирующих тканях

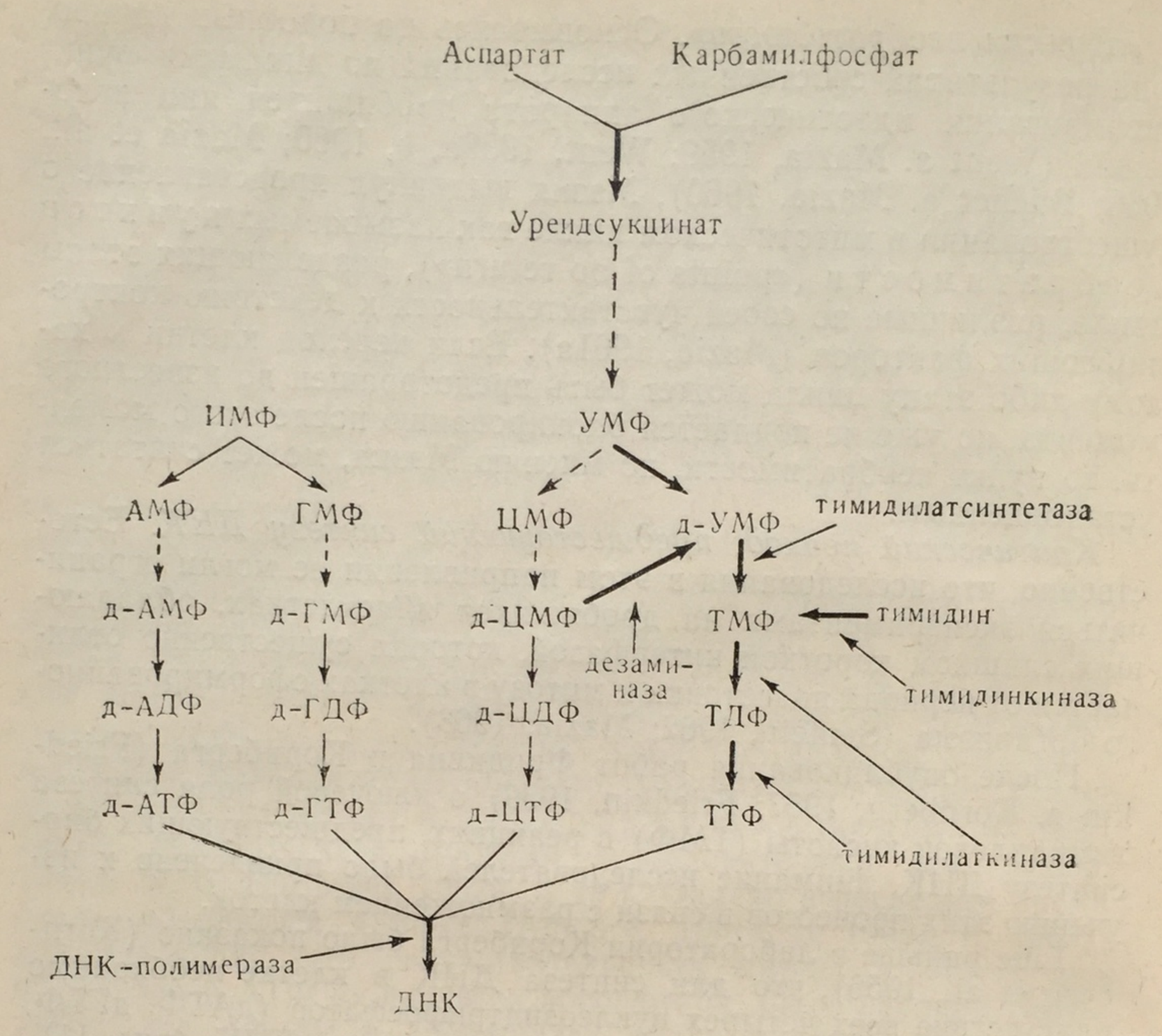


Рис. 11. Упрощенная схема биосинтеза ДНК (Davidson, 1961)
ИМФ — инозинмонофосфат; УМФ — уридинмонофосфат; АМФ, АДФ и АТФ — аденозинмоно-, ди- и трифосфат; ГМФ, ГДФ и ГТФ — гуанозинмоно-, ди- и трифосфат; ЦМФ, ЦДФ и ЦТФ — цитидинмоно-, ди- и трифосфат; ТМФ, ТДФ и ТТФ — тимидинмоно-, ди и трифосфат; д-дезокси... Жирными стрелками обозначены реакции, интенсивно протекающие в быстропролиферирующих тканях

примерно в равных количествах (Bollum a. Potter, 1959; Weissman, Smellie a. Paul, 1960; Hiatt a. Bojarski, 1960; см. обзор Canellakis, 1962). Это привело к заключению о важной роли киназ тимидиловой системы в регуляции пролиферативных процессов (O'Brien, 1962; Шапот, 1963а, б; Цанев и Марков, 1964а, и др.) и о значении для митоза событий, казалось бы, далеко от него отстоящих. Было высказано предположение о том, что пусковой («триггерный») механизм митоза действует на значительно более раннем этапе митотического цикла, чем период, непосредственно предшествующий делению клетки (Sisken a. Kinosita, 1961, 1962; Defendi a. Manson, 1963; и др.), и, таким образом, постулировано существование еще одного критического периода в цикле.

5. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОНТРОЛЬ СОБЫТИЙ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Установив при исследовании пыльника Lilium longiflorum, что началу синтеза ДНК в микроспорах, сопровождающемуся волной синхронных митозов, предшествует внезапное и кратковременное появление тимидинкиназы, Хотта и Стерн (Hotta a. Stern, 1963a, b) сделали заключение об индуктивном характере синтеза этого фермента в микроспорах (чрезвычайно сходного с адаптивным синтезом ферментов у бактерий). Продолжив эти исследования с применением различных ингибиторов белкового синтеза и синтеза РНК и изучив в том же плане процессы, предшествующие мейозу в микроспорах пыльника Trillium erectum (Hotta a. Stern, 1963c, d), они пришли к выводу о том, что синтез белков de novo происходит во время митотического (а равно и мейотического) цикла неоднократно, причем каждый раз ему предшествует появление фракции и-РНК.

Стерн и Хотта (Stern a. Hotta, 1963a, b) предполагают, что на протяжении митотического цикла происходит последовательная активация отдельных генов, обусловливающих продукцию специфических и-РНК и белков, чем и определяются направленность и характер процесса. Активация генов необходима для выхода информации, записанной в геноме в процессе эволюции. Не исключено, что эта информация может оказывать влияние на характер распределения хромосом в митозе или мейозе. Различия между этими процессами контролируются иными механизмами, чем те, которые регулируют синтез ДНК в клетке. Появление новых фракций специфических белков происходит на протяжении всего митотического (и мейотического) цикла, не только после завершения редупликации ДНК, но и после редупликации и конденсации хромосом. Эти события могут быть вызваны различными причинами: так, например, «триггерным» фактором, способствовавшим синтезу белка и началу мейоза в микроспорах Trillium, явилось охлаждение (Hotta a. Stern, 1963d). Применяя различные ингибиторы биосинтеза макромолекул, Хотта и Стерн (1963a, d) показали, что события, развивающиеся на протяжении митотического (и мейотического) цикла, так же диссоциабильны, как и процессы, протекающие во время самого митоза (Александров, 1962; см. гл. I, раздел 1, а также данные настоящей главы о диссоциабильности митоза и редупликации ДНК). Это привело их к заключению, что периодическая активация отдельных генов на протяжении митотического цикла обусловлена факторами, лежащими вне хромосом. Во всяком случае гены, определяющие последовательность событий митотического цикла, не входят в состав одного оперона (см. рис. 7).

По мнению Стерна (1964), каждый из этих периодов представляет собой «микроцикл» (рис. 12), включающий следующие

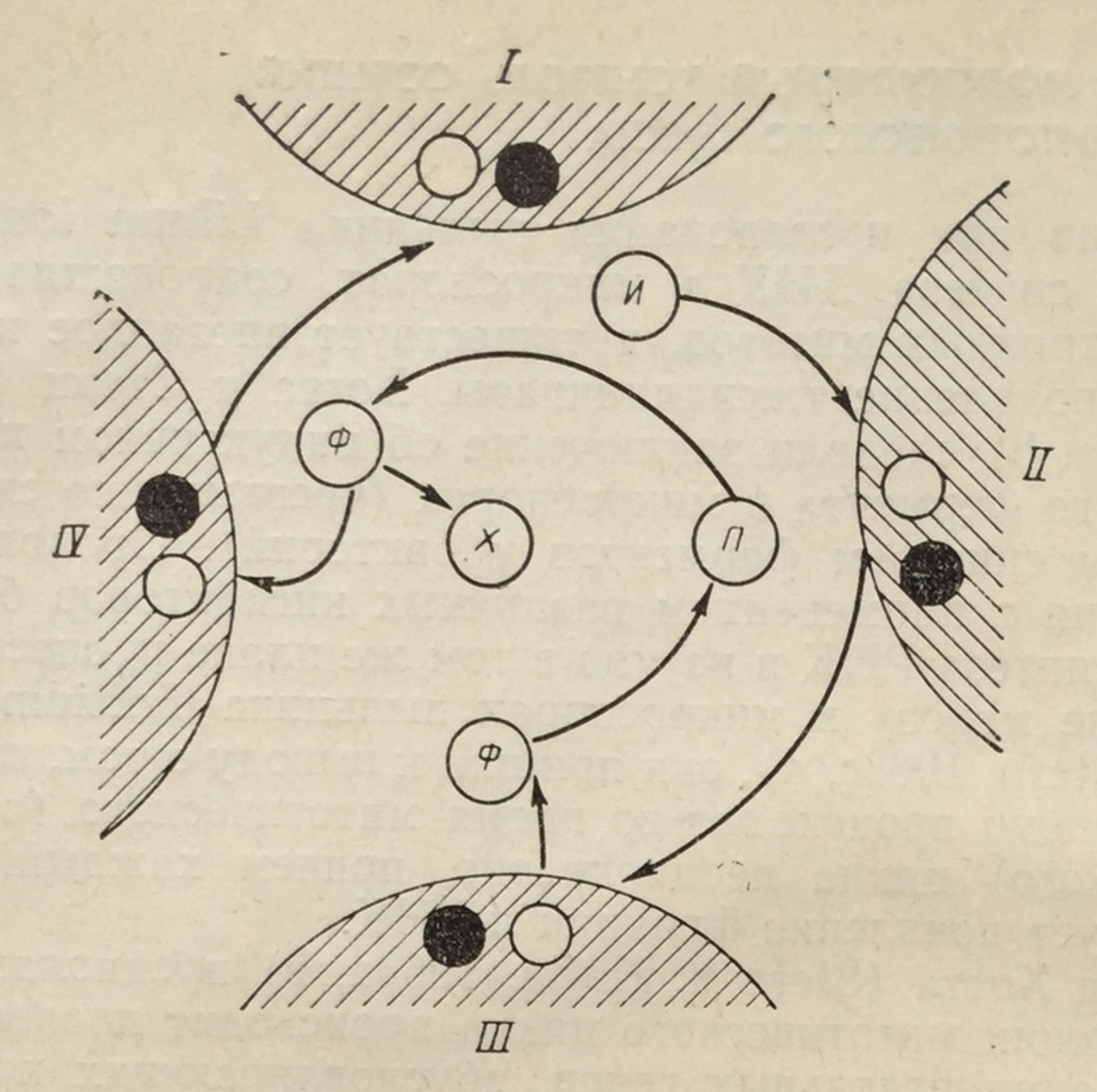


Рис. 12. Гипотетическая схема «микроцикла» (Stern, 1964)

Заштрихованная зона — геном; черный и белый кружки — регулятор и структурные гены. Между заштрихованными зонами — внехромосомная часть клетки. *И* — индуктор; *Ф* — фермент (белок); *П* — продукты катализа; *Х* — судьба фермента после его разрушения. *I* — ген неактивен; *II* — активация гена; *III* — ген активен; *IV* — подавление активности гена

основные фазы: индукцию активности гена, ведущую к образованию белка (фермента), каталитическое преобразование фермента (в результате возникает конечный продукт, приводящий к инактивации фермента) и подавление белкового синтеза. При этом, как было показано в опытах с применением различных анализаторов биосинтеза макромолекул, фазы индукции активности гена и подавления белкового синтеза протекают с непосредственным вовлечением генома, в то время как регуляция процесса инактивации фермента осуществляется внехромосомными компонентами.

Из работ Хотта и Стерна вытекает принципиально важное положение о том, что критические состояния (активация гена) могут возникать в митотическом цикле неоднократно. Это значит, что в митотическом цикле имеется по меньшей мере несколько критических периодов, характеризующихся повышенной чувствительностью к воздействиям. По-видимому, такие критические периоды предшествуют «пунктам необратимости», установленным Мэзия, пройдя которые, клетка становится нечувствительной к факторам, действовавшим на нее в предыдущий период.

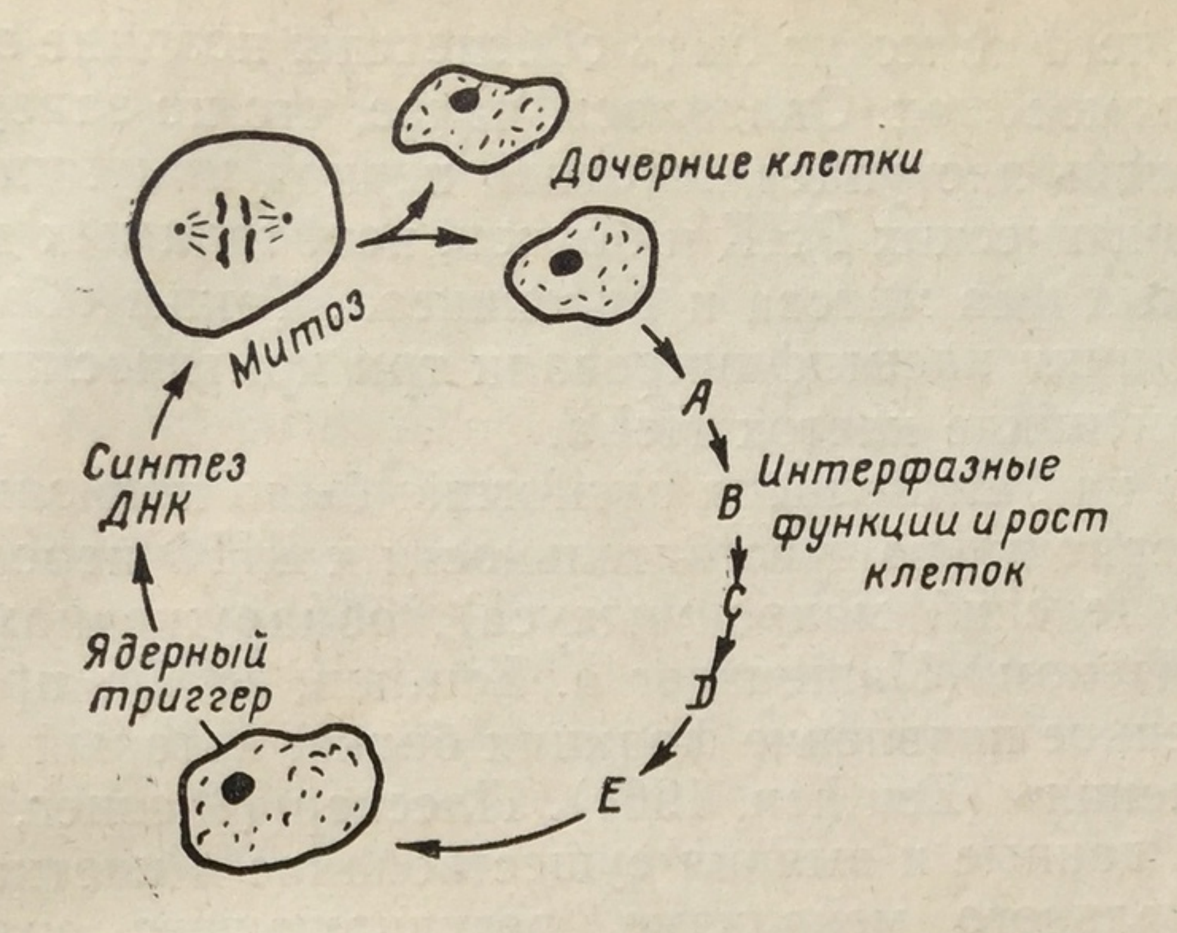


Рис. 13. Гипотетическая схема жизненного цикла клеток млекопитающих (Mueller et al., 1962)

A — E — стадии («барьеры»), преодолеваемые клеткой при прохождении периода интерфазы, предшествующего началу репликации ядерных структур

Эти положения находят экспериментальное подтверждение в работах последнего времени, в частности в исследованиях Мюллера и сотрудников (работы по механизму действия эстрогенов, вышедшие из этой лаборатории, будут подробно освещены в гл. V).

На синхронизированной культуре клеток HeLa с помощью антибиотиков было показано, что в пределах одного ядра ДНК может находиться в двух физиологических состояниях: 1) ДНК, способная к репликации (компетентная) и 2) ДНК, становящаяся способной к репликации при активировании белкового синтеза (см. гл. VI). Другими словами, одни молекулы могут быстро начинать синтез ДНК, другим же нужен дополнительный стимул («триггерная» информация) для приобретения компетентности. Роль стимулятора («триггерного» фактора) выполняет вновь образованный белок, синтез которого был в свою очередь вызван действием синхронизаторов (Mueller et al., 1962; Stubblefield a. Mueller, 1962). Авторы рассматривают митоз и интеркинез как единый циклический процесс, на протяжении которого в клетке постепенно развертывается ряд «молекулярных событий», включающих периоды синтеза и активации специфических макромолекул и контролирующих прохождение клетками митотического цикла (рис. 13).

Дальнейшие исследования на культуре клеток HeLa показали (Mueller, 1963), что и те клетки, которые уже приступили к синтезу ДНК, нуждаются в дополнительном синтезе РНК и белков

de novo, без чего не могут быть обеспечены поздние этапы синтеза ДНК в хромосомах. Оказалось, далее, что по завершении синтеза ДНК вновь наступает короткий период индукции-репрессии синтеза специфических РНК и белков, необходимых для прохождения видимых фаз митоза и цитокинеза. Таким образом, Мюллер и сотрудники идентифицировали три критических периода в митотическом цикле клеток HeLa.

В опытах на Tetrahymena pyriformis было показано, что критическому периоду (по чувствительности к ДНФ перед вспышкой синхронных делений макронуклеуса), обнаруженному Хамбургером и Цейтеном (Hamburger a. Zeuthen, 1957), предшествует кратковременное появление фракции белка, который был назван «белком деления» (Zeuthen, 1961). Плеснер (Plesner, 1963) подтвердил эти данные и выявил существование в клетках Tetrahymena специального механизма, регулирующего снятие вновь синтезированного белка с рибосом. Он полагает, что изменение чувствительности к ингибиторам дыхания во время критического периода носит вторичный характер.

Опыты с аминокислотным голоданием культуры Tetrahymena (G. E. Stone, 1963; G. E. Stone a. Prescott, 1964) позволили обнаружить у нее существование еще одного критического периода в пределах самой фазы синтеза ДНК: удаление из среды гистидина и триптофана, препятствовавшее очередному делению макронуклеуса, не влияло на ход событий по прошествии этого периода. Сходные данные были получены в опытах на Tetrahymena с недостаточностью пиримидинов (Cameron, 1963).

Комбинируя время действия пуромицина и хлорамфеникола на клетки культуры карциномы человека KB, Тэйлор (E. W. Taylor, 1963a) рассчитал, что митозу предшествует критический период повышенной чувствительности к ингибиторам белкового синтеза, который наступает в исследуемой культуре через 2 часа после окончания *S*-периода и продолжается около 2,5 час.

Связь между отдельными событиями митотического цикла во времени была убедительно продемонстрирована в опытах на плазмодии миксомицета Physarum polycephalum с синхронно делящимися ядрами; эти работы успешно проводятся в лаборатории Раша (Nygaard a. Guttes, 1962; Guttes a. Guttes, 1962, 1963, 1964; Rusch a. Sachsenmeier, 1963; Braun, Mittermayer a. Rusch, 1963, и др.). Особенно интересным следует считать обнаружение в клетках Physarum двух фракций РНК, определяющих разные события: удлинение продолжительности интерфазы и задержку клеток в метафазе. При этом фракция РНК, ответственная за переход клеток от метафазы к анафазе, оказалась значительно более чувствительной к актиномицину *D*.

Критические периоды митотического цикла были выявлены в экспериментах на синхронизированных клетках Astasia longa (M. Padilla a. van Dreal, 1963; G. M. Padilla a. Blum, 1963),

на клетках волосков традесканции (Отрощенко и Сахаров, 1964; Сахаров и др., 1965), в культуре клеток HeLa S3 (Puck a. Steffen, 1963; Puck, 1963), в различных культурах клеток человека (Erikson a. Szybalski, 1963), в культурах опухолевых клеток (Seed, 1963), при инфицировании клеток некоторыми вирусами (Kit, Dubbs a. Piekarski, 1963; Kit a. Dubbs, 1963; Roizman, 1963).

Поток экспериментальных исследований в этом направлении оказался так велик, а объекты столь разнообразны, что еще не появилось специальной сводки по критическим периодам митотического цикла. Исключение составляет монография Цанева и Маркова «Биохимия клеточного деления» (1964а), в которой содержатся в обобщенном виде многие данные, касающиеся пусковых механизмов митотического цикла. Вместе с тем в последнее время опубликовано большое количество статей, посвященных рассмотрению отдельных сторон проблемы (Lwoff et Lwoff, 1962; W. S. Bullough, 1963; Lark, 1963; Quastler, 1963а; Oehlert et al., 1963; Puck a. Steffen, 1963; Шапот, 1963а, б; Жинкин, 1963; Mazia, 1963, 1964, и др.; о работах Хотта и Стерна, а также Мюллера уже было сказано выше). Это позволяет суммировать некоторые представления в области регуляции митотического цикла.

6. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ

Вступление клетки в митотический цикл. Прежде всего, по единодушному мнению, клетка, закончив митоз, не сразу вступает в новый митотический цикл. Этому событию предшествует критический период — по терминологии Буллоу (W. S. Bullough, 1963), дихофаза [3],— когда клетка «принимает решение» (Quastler a. Sherman, 1959; Mazia, 1961а; W. S. Bullough a. Laurence, 1964b), будет ли она снова делиться. В быстро пролиферирующих тканях или эмбриональных объектах, где митозы следуют один за другим, этот критический период может наступать сразу же вслед за митозом или даже совпадать по времени с одной из его фаз (см., например, Мэзия, 1960а, и др.). В медленно пролиферирующих тканях он отделен от митоза значительным интервалом времени.

Исследовав ранние изменения в регенерирующей печени, которые предшествуют обычно наблюдаемому последовательному возрастанию активности ферментов, участвующих в биосинтезе предшественников ДНК, Цанев и Марков (1964б) обнаружили в первые часы после гепатэктомии значительное снижение содержания ядерной РНК в ткани и способности РНК связывать основные красители, что привело их к заключению о наличии определенного этапа «репрограммирования» метаболизма клеток

[3] От греческого διχα — на две части; термин, отражающий возможность выбора двух путей.

при вступлении в митотический цикл,— мысль, развивающая представления Суонна (Swann, 1957, 1958; см. гл. IV). Строго говоря, только по прошествии этого критического периода и начинается пресинтетический период митотического цикла G_1, который, по-видимому, значительно короче, чем его обычно изображают на схемах. В связи с этим Лайта (Lajtha, 1963) предлагает различать внутри пресинтетического периода две стадии: G_0 (период, когда клетка закончила деление, но еще не вступила в следующий митотический цикл) и G_1, то есть собственно пресинтетический период. Однако эта терминология встречает возражения ввиду отсутствия четких биохимических критериев для каждой из двух стадий (Prescott, 1964).

События, развертывающиеся в клетке на протяжении периода G_1, представляют собой последовательную цепь реакций, приводящих к синтезу ДНК (см. Ларк, 1963; Цанев и Марков, 1964а). Хотя эти реакции достаточно хорошо изучены, до сих пор нет единого мнения о том, что же является «инициатором» синтеза ДНК в клетке.

Вступление клетки в S-период. В принципе контролирующие механизмы могут действовать на следующие этапы биосинтеза ДНК (см. рис. 12):

1. Они могут регулировать пул предшественников ДНК, доводя его до определенной критической концентрации. В этом случае называют несколько «узких мест» реакций, воздействие на которые в наибольшей степени отражается на темпах клеточного размножения:

а) образование карбамиласпартата из карбамилфосфата — самая первая ступень синтеза пиримидинов de novo (Handschumacher a. Welch, 1960). Блокируется уретаном, обладающим антилейкозным действием (см. Белоусова, 1963);

б) восстановление рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды (Reichard, Canellakis a. Canellakis, 1961). Как показали Мэнсон и Дефенди (Manson a. Defendi, 1962), одним из самых ранних изменений при облучении культуры *L*-5178Y, приводящих к торможению деления клеток, является подавление редуктаз рибонуклеотидов. Однако этот случай, как и случай «а», по-видимому, не типичен для пролиферирующих тканей;

в) образование тимидиловой кислоты (Friedkin, 1959);

г) фосфорилирование тимидиловой кислоты (ТМФ) до ТТФ под влиянием тимидилаткиназы (работы лаборатории Корнберга и др.).

О значении двух последних этапов в процессах клеточной пролиферации уже говорилось выше. Однако, несмотря на, казалось бы, убедительные данные о повышенной активности тимидилатсинтетазы, тимидин- и тимидилаткиназы в быстро растущих тканях, имеются факты, свидетельствующие о том, что активность этих ферментов нарастает в некоторых случаях уже после

того, как клетки приступили к синтезу ДНК (Bianchi et al., 1962; Ancill, 1963); следовательно, активность ферментов, катализирующих образование и фосфорилирование ТМФ, не может являться единым узловым звеном пускового механизма биосинтеза ДНК в митотическом цикле (см. Ларк, 1963, и др.).

Помимо всего вышесказанного, следует иметь в виду, что нарастание пула предшественников ДНК в клетке лимитируется наличием многочисленных механизмов обратной связи: в частности, повышение концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов препятствует восстановлению рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды и т. д. (см. Canellakis, 1962; Кафиани, 1963а, б; Цанев и Марков, 1964а, и др.). Таким образом, пул предшественников ДНК в клетке, по-видимому, не является основным фактором, определяющим вступление клетки в *S*-период.

2. Следующими точками приложения действия механизмов регуляции биосинтеза ДНК в клетке могут служить синтез или активация ДНК-полимеразы. Этот вопрос долгое время был дискуссионным, так как оставалось неясным, синтезируется ли данный фермент в ядре или в цитоплазме (Prescott, Bollum a. Kluss, 1962, и др.), и если верно второе, то какова роль ядерной оболочки в контроле биосинтеза ДНК.

Однако последние данные, полученные в лаборатории Мэзия (Hinegardner a. Mazia, 1962; Mazia a. Hinegardner, 1963; Mazia, 1963), свидетельствуют о том, что изолированные ядра яиц морского ежа содержат ДНК-полимеразу в больших количествах. Основываясь на результатах последовательного количественного определения содержания этого фермента в яйцах в процессе дробления Мэзия (Mazia, 1963) приходит к заключению, что взаимодействие ДНК и ДНК-полимеразы является критическим событием, обусловливающим начало и окончание синтеза ДНК. Более того, по мнению Мэзия, факторы, регулирующие уровень ДНК-полимеразы в ядре, осуществляют и «контроль дальнего действия» («long-range control»), то есть определяют вступление клеток в митоз.

Шапот (1963б) полагает, что в медленно пролиферирующих тканях синтез ДНК сдерживается низкой активностью двух ферментов: тимидилаткиназы и ДНК-полимеразы. Следовательно, воздействием на ДНК-полимеразу можно регулировать вступление клеток в *S*-период.

Однако в опытах на *L*-фибробластах мыши было показано (Powell, 1962b), что, несмотря на значительное подавление синтеза ДНК через 5—8 час. после обработки культуры пуромицином, активность ДНК-полимеразы не снижается. Сходные данные были получены на бактериях (Billen, 1962).

Таким образом, активность ДНК-полимеразы так же, как и пул предшественников ДНК, видимо, не является основным фактором, определяющим вступление клеток в *S*-период.

3. Наконец, регуляция биосинтеза ДНК может происходить путем активирования самой матрицы ДНК и создания так называемого затравочного состояния молекулы. Для этого необходима хотя бы частичная денатурация ДНК с образованием однонитчатой формы.

Естественно, что возник вопрос о роли в этом процессе специфических ферментов — дезоксирибонуклеаз (ДНК-аз I и II). Еще раньше было показано, что синтезу ДНК в клетке предшествует повышение активности ДНК-азы (Brody a. Westman, 1960; Brody a. Wiqvist, 1961), а затем были получены данные об активации синтеза ДНК добавлением небольших количеств ДНК-азы (Kiefer et al., 1961; Keir, Binnie a. Smellie, 1962; Sarkar, 1963, и др.). Как показал Стерн (Stern, 1961, и др.), началу синтеза ДНК в микроспорах Lilium longiflorum также предшествует нарастание активности ДНК-азы.

Исходя из этих данных, а также результатов собственных исследований, указывающих на то, что усилению клеточной пролиферации после механического повреждения эпидермиса предшествуют разрыв связей между РНК и белками с последующим распадом РНК благодаря активированию рибонуклеаз, Цанев и Марков (1964а) выдвигают гипотезу, согласно которой пусковой механизм клеточного деления приводится в действие активированием всех внутриклеточных нуклеаз (как ДНК-аз, так и РНК-аз).

Относительно механизма действия нуклеаз как «триггерных» факторов вступления клеток в *S*-период почти ничего неизвестно. Мэзия и Хайнгарднер (Mazia a. Hinegardner, 1963) высказывают предположение о «самозатравочном» (self-primed) синтезе ДНК, обусловленном затравкой ядерной полимеразы ДНК-азой того же ядра.

В опытах Ша (Shah, 1963) предварительная инкубация клеток культуры HeLa с РНК-азой и ДНК-азами I и II приводила к повышению включения в ДНК H^3-тимидина, причем особенно активной оказалась РНК-аза. Ша делает заключение, что последняя, возможно, подавляет репрессорную функцию РНК по отношению к реплицирующейся молекуле ДНК.

Несмотря на многочисленные данные о важной роли нуклеаз в биосинтезе ДНК, Ларк (Lark, 1963) полагает, что не они являются фактором, определяющим начало репликации ДНК в клетке. Он считает, что состояние пресинтетической денатурации ДНК in vivo достигается таким изменением ее молекулы, которое понижает температуру денатурации до физиологических пределов, что может быть обеспечено неспецифическими и мягкими воздействиями на клетку (см. также данные Хотта и Стерна, 1963).

Взгляды Ларка очень близки представлениям Львова и Львовой (Lwoff et Lwoff, 1962), которые предполагают, что все основ-

ные события, обеспечивающие репродукцию клеток,— будь то активация фермента или активация матрицы,— связаны с обратимыми изменениями структуры молекулы вследствие смещения какой-либо одной реакции, что может быть вызвано малейшими сдвигами температуры. В подтверждение приводятся данные по температурной синхронизации деления клеток воздействием на ранние этапы синтеза ДНК (см. обзор Ломакиной, 1963).

Таким образом, подытоживая этот раздел, следует сказать, что хотя в разных видах клеток отдельные звенья биосинтеза ДНК могут обладать большей или меньшей чувствительностью к воздействиям (см., например, Quastler, 1963a), один из основных механизмов, контролирующих вступление клеток в S-период, действует, по-видимому, на уровне молекулы ДНК, обеспечивая ее затравочное состояние.

Общим для разных видов клеток является также образование белковой фракции (дополнительный синтез белка), индуцирующее начало синтеза ДНК (Мюллер и сотрудники, Хотта и Стерн; см. также Fujioka et al., 1963, и др.). При этом вновь образующийся белок иной природы, чем ферменты, участвующие в биосинтезе ДНК (Ларк, 1963); он не является также гистоном (Shah, 1963).

Тот факт, что различными ингибиторами белкового синтеза, (а по некоторым данным, и ингибиторами синтеза и-РНК) можно подавить начало синтеза ДНК, но лишь до определенного момента, свидетельствует о существовании критического периода, предшествующего переходу клеток из периода G_1 в S-период. Пройдя этот период, клетки становятся на некоторое время нечувствительными к ингибиторам белкового синтеза («пункт необратимости»), и синтез ДНК продолжается.

Вступление клетки в период G_2 и в митоз. По данным Мюллера (Mueller, 1963), последние этапы синтеза ДНК в клетке можно снова блокировать ингибиторами белкового синтеза и синтеза и-РНК. Следовательно, переходу клеток из S-периода в премитотический период G_2 также предшествует определенный критический период, сменяющийся новым «пунктом необратимости».

Наконец, последний из установленных пока критических периодов предваряет уже само деление клеток и вновь характеризуется временным повышением чувствительности к ингибиторам белкового синтеза (по данным Мюллера, и к ингибиторам синтеза и-РНК). Как было сказано выше, первоначальные попытки связать этот критический период с «наполнением» и «опорожнением» энергетического резервуара (Суонн) в настоящее время не находят подтверждения (Epel, 1963; Mazia, 1963). Имеются все основания предполагать существование критических периодов и в самом митозе (Gaulden a. Perry, 1958; и др.).

Таким образом, на протяжении митотического цикла клетки неоднократно вступают в критические периоды (состояния), совпадающие, по-видимому, со сменой функционирования отдельных генов, что обеспечивает клетку необходимой информацией для дальнейшего прохождения цикла (в виде продукции специфических и-РНК и белков) и определяет направленность событий например, вступление клетки в следующий митотический цикл или же переход к дифференцировке.

Гросс и Кузино (Gross a. Cousineau, 1963a, b, c, 1964) показали, что при воздействии актиномицином *D* на развивающиеся яйца морского ежа Arbacia punctulata деление клеток может продолжаться в течение нескольких часов, но дифференцировка полностью подавляется. Они делают заключение, что вступление клеток в митоз определяется ранним образованием стабильной и-РНК, в то время как дифференцировку обеспечивает более «поздняя» фракция и-РНК, которая значительно менее стабильна.

Эти данные находятся в соответствии с результатами исследований на системе фаг-бактерия (Хесин, 1965), в которых была установлена смена синтеза одних и-РНК и специфических белков другими и показано, что на разных стадиях развития фага в его хромосоме функционируют различные гены. Обсуждая полученные результаты, Хесин высказывает предположение о том, что при развитии яйцеклеток высших животных также могут быть заранее подавлены или активированы определенные гены.

Спирин и сотрудники (1964), выявляя быстрометящиеся фракции РНК на различных стадиях развития зародышей вьюна, пришли к заключению, что последовательность прохождения стадий в процессе клеточной дифференцировки, определяемая синтезом специфических белков, обеспечивается не периодичностью РНК-синтезирующей активности ядер, а периодичностью в «репрограммировании» рибосом (когда с рибосомами получает возможность связываться новая и-РНК, а старая, связанная с ними ранее, распадается). Периоды репрограммирования могут наступать вследствие депрессии некоторых генов.

Пусковые механизмы митотического цикла. Из всего сказанного следует, что события, развертывающиеся на протяжении митотического цикла, управляются системой пусковых механизмов, каждый из которых может явиться объектом воздействия.

В основе пусковых механизмов, как это вытекает из экспериментальных данных различных исследователей, по-видимому, лежит последовательная активация одних генов и репрессия других, что приводит к возникновению в митотическом цикле критических периодов (состояний), во время которых происходит смена типов синтеза специфических макромолекул (синтез новых и-РНК или, возможно, «репрограммирование» рибосом?), определяющих дальнейшее прохождение цикла и вступление клеток

в митоз. Подобное представление по существу не является новым. Значение роли генов в реакциях биосинтеза, определяющих последовательность событий эмбрионального развития (генетическая предетерминация раннеэмбриональных признаков), отмечал Астауров (1948) и другие.

Однако существования сходной системы регуляции событий митотического цикла до последнего времени не выявлено.

Система «пусковых механизмов митотического цикла», как мы их назвали выше, указывает на отсутствие единого пускового, или «триггерного», механизма и, следовательно, единой ключевой реакции, ответственной за этот процесс, как предполагали Буллоу, О'Брайен и др. (см., например, W. S. Bullough, 1952, 1955; O'Brien, 1962).

Вместе с тем в пределах каждого критического периода митотического цикла имеются реакции, неравноценные по восприятию регулирующих влияний. Рассмотренный выше фактический материал позволяет считать, что в основе чувствительности критических периодов лежат так называемые тахостатические реакции (см. гл. I), определяющие скорость процесса (Энгельгардт, 1960).

Поскольку суммарная скорость сложного процесса не может быть выше скорости наиболее медленного его звена, то такие «медленные звенья» и являются узкими местами в цепи метаболических превращений.

По-видимому, тахостатическим реакциям принадлежит огромная роль в развитии событий на протяжении митотического цикла. Управляемые по принципу отрицательной обратной связи (Энгельгардт, 1960), эти реакции могут определять вступление или выход клеток из цикла, а также переход от одного этапа цикла к другому, являясь одновременно точками приложения действия факторов, регулирующих деление клеток. В этом заключается биологический смысл критических периодов митотического цикла.

Нарушение подобной системы регуляции может приводить к тяжелым последствиям. Так, например, Шапот (1963а) считает, что в процессе злокачественного перерождения клеток вследствие изменений в их генетическом аппарате возникает новый изозимный (изоэнзимный) профиль ключевых ферментов с последующим исчезновением «медленных звеньев» важнейших биохимических процессов. Это обстоятельство делает на определенном этапе невозможной регуляцию пластических биосинтезов и деления клеток в опухоли.

Рассмотрение данных о наличии критических состояний в жизненном цикле сформированных клеток представляет интерес в связи с известными фактами существования критических периодов в эмбриональном развитии организмов (термочувствительная стадия в эмбриогенезе тутового шелкопряда — Астау-

ров, 1958; Астауров и др., 1958; периоды различной функциональной активности ядер зародыша вьюна — Нейфах, 1959, 1961; критические периоды в эмбриональном развитии млекопитающих и других организмов, отличающиеся повышенной неспецифической чувствительностью к воздействиям — Светлов, 1960, и др.). Это позволяет предполагать, что подобный принцип регуляции, состоящий в периодическом возникновении критических состояний, благодаря последовательной активации отдельных генов распространяется на более широкий круг явлений, чем митотический (и мейотический) цикл, создавая оптимальные возможности функционирования самых разнообразных биологических систем.

Глава III

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА, СВЯЗАННЫЕ С ДЕЙСТВИЕМ ГОРМОНОВ

1. СУТОЧНАЯ ПЕРИОДИЧНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

Вопрос о суточной периодичности деления клеток является частью общей проблемы биологических ритмов, чрезвычайно широко распространенных в природе (см. Reinberg et Ghata, 1957; Stephens, 1959; сб. «Biological clocks», 1960, из серии Cold Spring Harbor Symposia; Эмме, 1960, 1962; Sollberger, 1962, 1964; Доброхотов, 1963; Hendricks, 1963; Harker, 1964, и др.). Суточная периодичность митозов, как и других физиологических процессов, представляет собой одно из проявлений многочисленных приспособительных функций организма, направленных на поддержание его устойчивости (см. гл. I, раздел 2).

Изменения митотической активности на протяжении суток описаны у одноклеточных организмов и растений (см. Karsten, 1918; Rotta, 1949; Hageman, 1956; Гриф, 1959; Mazia, 1961a; Schreiter u. Meinl, 1963, и др.), у амфибий (Meyer, 1954, 1958; Scheving et al., 1959; Доброхотов и Маркелова, 1960, и др.), птиц (Riley, 1937), грызунов (см. дальше), кошек (van Leyden, 1917) и человека (Broders a. Dublin, 1939; Cooper a. Schiff, 1938; Cooper, 1939; Scheving, 1959). Среди грызунов подавляющее большинство исследований выполнено на мышах и крысах, у которых суточный ритм митозов обнаружен в эпителии роговицы (van Leyden, 1926; Уткин, 1953a; Vasama a. Vasama, 1957, 1958; Гололобова, 1958, 1959a; Алов, 1959; Косиченко, 1960, и др.), эпидермисе уха и кожи спины (Picón, 1933; Carleton, 1934; Cooper a. Franklin, 1940; Blumenfeld, 1942, 1943; W. S. Bullough, 1948a; Chaudry, F. Halberg a. Bittner, 1956d; Гололобова, 1958, 1959a; Алов, 1959, и др.), эпителии различных отделов кишечника (van Leyden, 1926; Klein u. Geisel, 1947; Bullough, 1948a; Гололобова, 1958, 1959a; Алов, 1959; Вегер, 1959; Райцина, 1961, и др.), эпителии пищевода (Sinha, 1957; Алов, 1959; Артемьева, Бабаева и Лиознер, 1960; Доброхотов и Курдюмова, 1962), корковом слое почек (Blumenfeld, 1938, 1942, 1944; Доброхотов и Курдюмова, 1960, 1961; Алов и Красильникова, 1962, и др.), печени (J. W. Wilson, 1948; Jardetzky, Barnum a. Halberg, 1956; F. Halberg, 1957;

Barnum, Jardetzky a. Halberg, 1958; Лиознер и Сидорова, 1959; Доброхотов, Бабаева и Курдюмова, 1962; Алов и Красильникова, 1962; Peters, 1962; Залетаева, 1963, и др.), костном мозгу (Goldeck a. Heinrich, 1949), различных отделах надпочечников (Mühlemann et al., 1955, 1956; F. Halberg et al., 1958; Kondics, 1962; Алов, 1962б; Доброхотов и Никанорова, 1962), эпителии языка (Алов, 1959; Виноградова, 1962), эпителии экзокринного отдела поджелудочной железы (Маркелова, 1962; Алов и Красильникова, 1962; Красильникова, 1962б), слизистой оболочке желудка (Тимашкевич, 1962, 1963; Clark a. Baker, 1963) и др. органах (Bullough, 1948a; Zander et al., 1954; Mühlemann et al., 1954, 1955; Mühlemann a. Hartl, 1955; Hartl, 1956; Kulenkampff, 1961, 1963; Романова, 1962; Trott a. Gorenstein, 1963; Simmons, 1964, и многие другие). В процессе исследования суточной периодичности деления клеток были высказаны различные гипотезы о причинах этого явления, в которых отразились две главных тенденции: стремление связать наблюдаемые закономерности с изменениями во внешней среде и попытка найти им объяснение в регуляционных возможностях самого организма.

Связь с двигательной активностью и энергетическим обменом. Блюменфельд (Blumenfeld, 1942) установил различия в суточном ритме митотической активности эпидермиса, слюнных желез и коркового слоя почек у крыс и на основании этого сделал вывод, что каждый орган обладает собственным ритмом клеточных делений. Однако Буллоу (Bullough, 1948a, b), исследовавший сразу большое число органов мыши (различные участки эпидермиса, эпителий пищевода, двенадцатиперстной кишки и семявыносящего протока, лимфатические узлы), наоборот, обнаружил между ними значительное сходство в суточном ритме митозов: в целом высокая митотическая активность наблюдалась в утренние часы, низкая — в вечерние. Характер полученных данных привел Буллоу к представлению о том, что митотический режим организма находится в обратной зависимости от его двигательной активности. Несколько позднее Буллоу, развивая эту линию исследований, предпринял параллельное изучение режима клеточных делений и углеводного обмена у мышей и сделал попытку связать суточную периодичность митозов в организме с колебаниями уровня сахара в крови (W. S. Bullough a. Eisa, 1950; W. S. Bullough, 1952c). К этому времени оформились его представления об определяющей роли глюкозы как энергетического фактора в регуляции деления клеток (см. гл. IV). Сущность гипотезы Буллоу сводилась к тому, что в течение суток клетки беспрепятственно проходят все этапы подготовки к делению, но вследствие различного уровня энергетического обмена в организме в утренние и вечерние часы неодинаковое количество их вступает в митоз, чем и объясняется суточный ритм митотической активности. Представления Буллоу, позднее поддержан-

ные Суонном (Swann, 1958), стимулировали многочисленные исследования по соотношению суточной периодичности митотической активности и обменных процессов в организме (см. Уткин, 1958; F. Halberg, E. Halberg et al., 1959; F. Halberg et al., 1960; Мовчан, 1961; Dziekanowska a. Nowak, 1961, 1962, и др.). Однако по мере расширения фактического материала становилось ясно, что суточные изменения митотической активности не являются однотипными для всех органов и что, следовательно, энергетический обмен всего организма не может быть единственным фактором, определяющим этот процесс.

Связь со световым режимом. В поисках новых объяснений наблюдаемых закономерностей в ряде лабораторий стали исследовать связь суточной периодичности клеточных делений со световым режимом животных. В этом направлении были достигнуты определенные успехи. Применяя инверсное освещение (свет в ночные часы и затемнение в дневные), Халберг и сотрудники (F. Halberg, Bittner a. Smith, 1957; F. Halberg et al., 1958, 1961, и др.) наблюдали полное извращение суточного ритма митозов в эпидермисе уха и в печени мышей. Такое же «зеркальное» изменение суточного ритма митотической активности у мышей (смещение максимума митозов с утренних часов на вечерние) было получено при инверсном освещении и в эпителиях языка, пищевода, кишечника (Алов, 1959, 1962а, и др.), роговицы (Алов, 1959; Косиченко, 1962) и молочных желез (Llanos a. Piezzi, 1963).

Существенные нарушения суточной периодичности клеточного размножения в эпителии роговицы наблюдались при содержании мышей в условиях непрерывного затемнения (Уткин и Косиченко, 1960) и непрерывного освещения (Косиченко, 1961а). Применяя непрерывное освещение, Гололобова (1962) получила сходные результаты на эпителии роговицы и эпидермисе крыс. В опытах с «укороченными сутками» (длительное чередование периодов 6-часового освещения и 6-часового затемнения) Косиченко (1962) удалось выработать в эпителии роговицы у мышей новый ритм митотической активности с наибольшим количеством делений в «дневное» и наименьшим — в «ночное» время «12-часовых суток».

Устойчивость к воздействиям. Не следует, однако, думать, что исследователи, которым удавалось добиться экспериментальной «переделки» суточного ритма митозов при изменении условий освещения, трактовали свои результаты как доказательство существования прямой зависимости суточной периодичности физиологических функций от смены дня и ночи. Наоборот, постепенно создалось единодушное мнение об огромной устойчивости суточного ритма митозов к самым разнообразным воздействиям. Оказалось, что закономерные изменения митотической активности на протяжении суток сохраняются при заживлении ран (Гололобова, 1959б; Виноградова, 1960; Красильникова, 1963а),

при голодании (Мовчан, 1961; Соколова, 1964; Galicich et al., 1963), в условиях медикаментозного сна (Соколова, 1962), гипофизэктомии (Райцина, 1961; Лиознер и сотрудники, 1962), при действии ионизирующей радиации (Косиченко, 1963; Мастрюкова и Стржижовский, 1964; Булгак, 1965, и др.), при наличии в организме перевиваемой опухоли (Гололобова, 1958) и наблюдаются даже в некоторых злокачественных новообразованиях (Voutilainen, 1953; Agrell a. Welin-Berger, 1957; Meng u. Pohle, 1961; Pohle, Meng u. Matthies, 1961; Llanos a. Bodran, 1961; Коломина, 1964; Peters et al., 1964).

Устойчивость суточного ритма клеточных делений проявилась и в опытах с нарушением светового режима. Так, Халбергу и сотрудникам (Halberg, Bittner a. Smith, 1957) удалось добиться достоверных показателей «зеркального» перемещения максимума и минимума митотической активности в эпидермисе и печени мышей лишь на 23-и сутки инверсного освещения. Косиченко наблюдала аналогичные сдвиги в эпителии роговицы мышей на 10-е сутки опыта, а в случае «укороченных суток» изменения наступали только на 19-й день. Меньше времени требовалось на расстройство суточной периодичности митозов эпителия роговицы путем непрерывного затемнения (3 дня) и непрерывного освещения (сутки). Однако даже длительное содержание мышей в условиях однородного освещения (в одном случае затемнение до 28 суток, в другом — освещение до 40 суток) не приводило к окончательному сглаживанию кривой суточного ритма митотической активности (см. Косиченко, 1961б).

Связь с функцией надпочечников. Такое проявление суточного ритма митозов в отсутствие периодических изменений в окружающей среде рассматривается как наглядное доказательство существования в организме внутренних факторов, определяющих суточную периодику митозов.

Работами Халберга и сотрудников (F. Halberg et al., 1954, 1958; F. Halberg, Peterson a. Silber, 1959, и др.) было показано наличие суточной периодичности поступления в кровь гормонов коры надпочечников у мышей с максимумом секреции в вечерние часы и минимумом — в утренние. Аналогичные результаты были получены и на крысах (Rinne a. Kytömäki, 1961). Таким образом, оказалось, что суточный ритм поступления в кровь кортикостероидов находится в обратной зависимости от суточной периодичности митозов у тех же животных; время наибольшего количества клеточных делений в эпидермисе уха и печени у мышей приходилось, по данным Халберга и сотрудников, на утренние часы, наименьшего — на вечерние. Инверсное освещение вызывало, как и в случае митотической активности, «зеркальное» изменение кривой секреции надпочечниками кортикостероидов. Совокупность полученных результатов, а также многочисленные работы других исследователей в области биологических ритмов позво-

лили Халбергу и др. (F. Halberg, Bittner a. Smith, 1957; F. Halberg, E. Halberg et al., 1959; F. Halberg et al., 1960; F. Halberg, 1963) построить гипотетическую схему регуляции суточного ритма митозов в организме [1].

Согласно этой схеме, наличие на протяжении суток в различных тканях организма «волн митозов», или синхронных делений, определяется системой синхронизаторов. В нормальных физиологических условиях главным (первичным) синхронизатором является суточная периодичность изменений в окружающей среде. Кроме того, в организме существуют вторичные синхронизаторы, которые начинают играть главную роль в определении суточной периодичности митозов (как и других физиологических функций) при нарушении нормальных условий существования и в отсутствие первичного синхронизатора. Так, например, при голодании суточный режим содержания эозинофилов в крови, подчиняющийся действию освещения, начинает зависеть от времени кормления животных (F. Halberg et al., 1953). Точно так же, по мнению Халберга, при нарушении светового режима ведущим фактором в определении суточной периодичности митозов становится периодическое поступление в кровь гормонов коры надпочечников, оказывающих тормозящее действие на деление клеток: усиление секреции кортикостероидов (в первую очередь глюкокортикоидов) в вечерние часы приводит к снижению числа митозов в тканях; в утренние часы наблюдается обратная картина. Поскольку у мышей, не воспринимающих световые сигналы (слепота), митотический режим нарушается, Халберг и др. (F. Halberg, Bittner a. Cole, 1959) предположили, что регуляция суточного ритма митозов происходит по классическому пути «свет — глаз — гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников» (см. Светозаров и Штрайх, 1941).

К этому времени Буллоу, пересмотрев свои прежние взгляды на роль глюкозы в регуляции суточной периодичности числа митозов, выдвинул новую гипотезу, согласно которой определяющее значение в этом процессе принадлежит адреналину, являющемуся, как и кортикостероиды, ингибитором клеточного деления. В опытах Буллоу и Лоуренс (W. S. Bullough a. Laurence, 1961b) удаление надпочечников у мышей препятствовало проявлению тормозящего действия усиленной двигательной активности на митотический режим эпидермиса уха; введение адреналина восстанавливало эту реакцию. Сопоставляя полученные данные с известным фактом повышенной секреции адреналина при различного рода эмоциональных и функциональных нагрузках

[1] Обычно Халберг пользуется термином циркадные («околосуточные») ритмы — от латинского circa — около, dies — день, подчеркивая этим неполную синхронизацию ритма физиологических функций организма с суточной периодичностью изменений в окружающей среде (см. F. Halberg et al., 1960, и др.).

(stress) и пониженной — в состоянии сна (см. следующий раздел), Буллоу и Лоуренс приходят к заключению, что адреналин является основным регулятором суточного ритма клеточных делений в эпидермисе уха мыши; периодическая секреция его надпочечниками прерывает равномерное прохождение клетками митотического цикла (W. S. Bullough a. Laurence, 1964a, b). Таким образом, в системе надпочечников был выявлен еще один синхронизатор суточного ритма митозов в организме. Однако это не означало, что надпочечники являются единственной системой в организме, выполняющей эту функцию.

Еще раньше было показано, что двусторонняя эпинефрэктомия не снимает суточного ритма митотической активности у мышей, а лишь понижает амплитуду колебаний; такой же эффект оказывает удаление щитовидной железы (Алов, 1959). Кроме того, было установлено (Доброхотов, Бабаева и Курдюмова, 1962; Маркелова, 1962; Красильникова, 1962б, в), что во многих органах наблюдается двукратный подъем митотической активности в течение суток, в то время как метаболическая активность надпочечников характеризуется одновершинной кривой.

Связь с режимом кормления. Работами Алова (1959, 1960, 1962а), Алова и Красильниковой (1962), Красильниковой (1962а, б, в) было показано существование связи между суточным ритмом митозов и режимом кормления животных. Так, например, при кормлении мышей в ночные часы максимум митотической активности в эпителии кишечника отмечался утром, а при кормлении в дневные часы — вечером. Меняя режим кормления, можно было добиться изменения характера суточной периодичности митозов и в других органах пищеварения: при получении мышами пищи в 21 час вместо 9 час. утра кривые суточных изменений митотической активности в эпителии слюнной и поджелудочной желез приобретали вместо двухвершинного одновершинный характер. В то же время извращение режима кормления не отражалось на суточной периодичности митозов в покровных эпителиях (кожа, роговица). Эти опыты показали, что режим кормления является синхронизатором суточного ритма клеточных делений в органах пищеварительной системы.

В разнообразных опытах еще раньше Блюменфельдом (Blumenfeld, 1944), а позднее Аловым и Красильниковой были получены новые данные в пользу широко распространенных представлений о существовании обратной зависимости между режимом митозов и функциональной активностью органов (Peter, 1925a, b, 1940; Picón, 1935, и др.). Ими было установлено, что действие общих синхронизаторов накладывается в организме на функциональный режим каждого органа, что и создает различия в суточном ритме митозов отдельных органов. Время наибольшей митотической активности в целом падает на утренние часы, а наименьшей — на вечерние, что связано с общим ритмом функцио-

нальной и в том числе двигательной активности лабораторных животных. Дополнительный максимум и минимум митотической активности некоторых органов пищеварения обусловлены кормлением животных в утренние часы. В соответствии с представлениями Халберга, Алов (1960, 1962а, 1964) делает общий вывод о том, что суточная периодичность митозов является следствием цепной реакции, в которую включаются различные факторы (синхронизаторы): суточная фотопериодичность, двигательная активность животных и ритм функциональной активности органов, обусловленный особенностями их метаболизма.

Регуляция суточного ритма митозов. Рассматривая фактический материал по суточной периодичности митотического деления, следует отметить, что почти весь он (не считая работ чисто описательного характера) относится к вопросам, связанным с изучением регуляции этого процесса. В этом направлении собрано большое количество данных, которые позволяют уже сейчас сделать некоторые общие заключения.

Существующая в природе периодичность явлений (суточные и сезонные изменения температуры, освещения и питания) привела к возникновению у организмов в процессе эволюции суммы приспособительных реакций, направленных на поддержание их устойчивости к факторам окружающей среды (см. Шмальгаузен, 1946). В ответ на изменения, связанные с постоянной сменой дня и ночи, в организме возник сложный гомеостатический механизм, обеспечивающий суточную периодичность физиологических функций организма, в том числе его митотического режима. К настоящему времени достаточно полно изучены лишь верхние, надклеточные «этажи» этой системы регулирования.

Соотношение регулирующих факторов на уровне целого организма. Роль гормонов. Главным пультом управления, или регулятором данной системы, как и в случае регулирования уровня сахара в крови (см. рис. 4), является комплекс промежуточный мозг — гипофиз. Основными управляющими воздействиями (см. гл. I, раздел 2) служат воздействия тех же самых экологических факторов, которые способствовали в процессе эволюции выработке суточной периодичности функционирования органов: светового режима как общего фактора и режима кормления для некоторых органов пищеварения.

Извращение светового режима, вызывая «перенастройку регулятора» на новое заданное значение регулируемой величины, приводит к «зеркальному» изменению периодичности функционирования органов, в том числе и к инверсии митотического режима. Интересно, что определяющим фактором в этом случае является свет, а не темнота, как это показывают опыты по искусственной синхронизации делений у различных объектов длительным выдерживанием их на свету с последующим затемнением: во время светового периода происходит блокирование

вступления клеток в митоз, а наступление темноты приводит к снятию блока и делению одновременно большого числа клеток (см. обзор Ломакиной, 1963). С этой точки зрения становится понятным, почему нарушения суточной периодичности митозов наступают при непрерывном освещении раньше, чем при непрерывном затемнении (опыты Уткина, Косиченко). Это подтверждают и данные Халберга (F. Halberg a. Barnum, 1961).

Извращение режима кормления также может играть роль управляющего воздействия по отношению к митотическому режиму некоторых органов пищеварения (например, двенадцатиперстной кишки, слюнной и поджелудочной желез), поскольку оно «перенастраивает регулятор» на новый суточный ритм митотической активности этих органов. Однако это воздействие не является универсальным управляющим воздействием даже в пределах органов пищеварения; так, например, оно не влияет на характер суточной периодичности клеточных делений в эпителии тонкого кишечника (Бочков, 1960б) и слизистой оболочке дна желудка (Тимашкевич, 1962). Поэтому режим кормления нельзя ставить в один ряд со световым режимом, который Халберг совершенно справедливо называет главным и первичным синхронизатором митотического деления клеток.

Многочисленные воздействия на организм, при которых полностью или частично сохраняется суточный ритм митозов (см. начало главы), следует отнести к категории возмущающих воздействий, так как вызываемые ими изменения устраняются самой системой регулирования. Нарушение режима кормления оказывает не управляющее, а только возмущающее воздействие на те органы пищеварительной системы, которые обладают собственным гомеостатическим механизмом, как, например, печень.

В уравновешивании этих воздействий большое значение имеет функция надпочечников, точнее, весь так называемый адреналовый комплекс (адреналин — АКТГ — кора надпочечников). Все виды раздражений сопровождаются усиленным поступлением в кровь адреналина, который в свою очередь стимулирует выделение гипофизом АКТГ (см. Эскин, 1960) и тем самым секрецию кортикостероидов. Повышение содержания последних в крови, наоборот, угнетает, как уже говорилось, адренокортикотропную функцию гипофиза, что создает дополнительный замкнутый контур регулирования. Таким образом, в общей системе регуляции суточной периодичности деления клеток в организме компоненты адреналового комплекса играют роль функциональных стабилизаторов, препятствующих усиленному размножению клеток и стабилизирующих таким образом митотический режим.

В нормальных физиологических условиях поступление в кровь адреналина и кортикостероидов в организме подвержено отчетливым суточным колебаниям с максимумом содержания в крови

в часы наибольшей двигательной активности: у лабораторных животных вечером (Эскин и сотрудники, 1956, 1958), у человека в первой половине дня (F. Halberg, Peterson, a. Silber, 1959; Sharp et al., 1961). При этом максимум двигательной активности совпадает с часами наименьшей митотической активности. Интересно, что у человека, в отличие от крыс и мышей, максимальное число клеточных делений в эпидермисе наблюдается в ночное время (Cooper a. Schiff, 1938; Cooper, 1939; Scheving, 1959).

Если принять, что период максимальной функциональной активности органа соответствует периоду его наименьшей митотической активности, то в надпочечниках лабораторных животных в вечерние часы должно обнаруживаться наименьшее количество митозов. Однако, по данным Мюлемана и сотрудников (Mühlemann et al., 1955, 1956), Халберга и сотрудников (F. Halberg, Frantz a. Bittner, 1957) и Алова (1962б), число митозов в корковом слое надпочечников крыс и мышей в отличие от всех других изученных органов, в вечерние и ночные часы является максимальным.

Это противоречие в значительной мере снято сейчас тщательно выполненным исследованием Доброхотова и Никаноровой (1962), в котором были получены данные о суточной периодичности клеточного деления отдельно в мозговом слое и в различных зонах коры надпочечников крыс. Оказалось, что максимальное количество делений в поздние вечерние часы и минимальное в ночные и дневные наблюдается лишь в клубочковой зоне (z. glomerulosa) коры надпочечников, клетки которой вырабатывают минералкортикоиды и, по-видимому, не подчиняются регулирующему влиянию АКТГ (Эскин, 1960; Brañez a. Roels, 1961; Милицына, 1961; Roels, 1963). Что же касается пучковой зоны (z. fasciculata), внешняя часть которой ответственна за секрецию глюкокортикоидов, и сетчатой — «резервной» — зоны (z. reticularis), находящихся под контролем гипофиза, то по характеру суточной периодичности митозов они не отличаются от других органов; минимум клеточных делений в них наблюдается в вечерние часы, то есть в период их максимальной секреторной деятельности, совпадающей с временем минимальной митотической активности в организме. Отсутствие четко выраженной периодичности митозов на протяжении суток в клетках мозгового слоя надпочечников свидетельствует о его большой функциональной лабильности.

Как было показано в опытах Халберга и др. (F. Halberg et al., 1958), при извращении светового режима кривая содержания кортикостерона в крови у мышей смещается на 180°, что еще раз указывает на важную роль надпочечников как органов, обеспечивающих равновесие в цепи регулирования суточной периодичности деления клеток в организме. В то же время компоненты адреналового комплекса нельзя рассматривать как единственные

регулирующие органы данной системы, поскольку отсутствие надпочечников и гипофиза не снимает феномена суточной периодичности митозов. Имеются данные, свидетельствующие о том, что к числу органов, участвующих в регуляции суточного ритма митозов, принадлежит также щитовидная железа (см. Алов, 1964 и др.).

В процессе эволюции у каждого вида выработался свой характер суточного режима митозов, связанный с особенностями функционирования регулирующих органов. Так, например, отсутствие суточной периодичности деления клеток в эпителии роговицы морских свинок (Косиченко, 1960) может быть обусловлено функциональными особенностями надпочечников этих животных — отсутствие способности к секреции кортикостерона (Hofmann, 1962), что делает невозможной быструю «перенастройку» элементов цепи регулирования.

Внутриклеточные факторы, определяющие суточный ритм митозов. Огромная устойчивость суточного ритма делений к различным воздействиям свидетельствует о наличии не только общих для всего организма и органных, но и внутриклеточных гомеостатических механизмов регуляции суточной периодичности процессов. Что же определяет в конечном итоге суточный ритм митозов? Если представить себе, что в многоклеточном организме животного эту роль выполняют системы, воспринимающие и перерабатывающие раздражения внешнего мира, в первую очередь нейро-гуморальные регуляторы, то как можно объяснить длительное сохранение привычного ритма суточной периодичности функций в отсутствие этих раздражений?

Красильниковой (1963б) было показано наличие суточного ритма митозов в различных органах (эпителий роговицы, эпидермис, двенадцатиперстная кишка и печень) 21—22-дневных эмбрионов мышей и крыс с максимумом делений в утренние и минимумом в вечерние часы суток. Содержание беременных животных в условиях извращенной фотопериодичности приводило, как обычно, к инверсии у них суточного ритма митозов, однако оно не изменяло суточного режима митотической активности эмбрионов.

Эти данные свидетельствуют о том, что наследуемые внутриклеточные гомеостатические механизмы регуляции суточной периодичности функций, являясь необычайно устойчивыми, играют на ранних стадиях развития значительно бо́льшую роль, чем в сформированном организме, где имеется сложная иерархия регуляторных механизмов, обеспечивающая быструю настройку системы на многочисленные воздействия. В таком случае, согласно биогенетическому закону, у одноклеточных организмов, обладающих наибольшими регуляционными возможностями (см. Оленов, 1959), следует ожидать и большей устойчивости суточного ритма деления клеток к изменению окружающих условий. Имеющиеся данные подтверждают это предположение.

В опытах на одноклеточном Gonyaulax polyedra (из класса жгутиковых) было показано (Sweeny a. Hasting, 1958), что суточная периодичность делений, наблюдаемая в естественных условиях освещения в виде «вспышек» митозов через каждые 24 часа, сохраняется и при непрерывном освещении слабым светом. Даже если искусственно удлинить время генерации клеток, то есть продолжительность интеркинетического периода, то и в этом случае митозы можно наблюдать только через 24-часовые интервалы времени. Это означает, что «команда» на деление подается всегда в одно и то же время, но что делятся лишь те клетки, которые уже подготовились к митозу, а остальные заканчивают подготовку и дожидаются следующего сигнала. В этих же условиях сохраняется способность и к суточной периодичности фотосинтеза (Hastings, Astrachan a. Sweeney, 1961). Дюбо (Dubos, 1959) указывает на необычайную устойчивость к внешним воздействиям суточного ритма фотоактивности другого жгутиконосца — эвглены. О большой устойчивости суточного режима клеточных делений у Paramecium bursaria свидетельствуют опыты Фольма (Volm, 1964).

Эта устойчивость суточного ритма функциональной активности организмов и в том числе суточного режима митозов обусловлена существованием у них способности измерять время, иначе говоря, наличием «биологических часов». В нормальных условиях работа эндогенных (внутриклеточных) «биологических часов» коррелирует с периодическими процессами, протекающими во внешней среде. На основании своих многолетних исследований на растениях Бюннинг (Bünning, 1958) пришел к заключению, что наиболее благоприятным для развития организмов является совпадение наследственной суточной периодичности с ритмом, обусловленным внешними факторами, и что, следовательно, эндогенный суточный ритм подвергается отбору. Примером этому может служить зависимость темпов размножения паразитов от суточного режима организма хозяина (см. Хейсин, 1937; Демина, 1953, 1959; Farmer a. Moore, 1962, и др.). Не случайно поэтому основным синхронизатором суточного ритма размножения паразитических простейших служит питание, а не свет. Если подвергать птиц инверсному освещению, но продолжать кормить их в обычное время суток, то ритм размножения паразитов не меняется (см. Хейсин, 1937).

Вопрос о механизмах «биологических часов» изучается в разных аспектах. Интересной является попытка выявить в организме многоклеточных отдельные клетки (или группы клеток), задающие ритм суточной активности. В серии изящных экспериментов Харкер (Harker, 1956, 1960a, b, 1961) удалось показать, что суточным ритмом физиологической активности таракана Periplaneta americana управляют несколько клеток подглоточного ганглия.

После того как была установлена внутриклеточная локализация «биологических часов», встал вопрос о том, какие структуры клетки участвуют в работе этого механизма. Было сделано наблюдение (Ehret, 1960, и др.), что «биологическими часами» обладают только «двухоболочечные» (two-enveloped) клетки, имеющие четко отграниченное от цитоплазмы ядро (одна оболочка — мембрана клетки, другая — мембрана ядра). На более низких уровнях организации («однооболочечные» клетки без обособленного ядра — бактерии, актиномицеты, молекулярные системы) «биологические часы» отсутствуют. Причины наблюдаемых различий пока не установлены, так как до сих пор остается неизвестной природа процессов, обусловливающих суточную периодичность.

Бюннинг (Bünning, 1958) высказывает общее представление о существовании в организме «внутреннего осциллятора, колеблющегося с периодом, определяемым суточным циклом и параметрами данной живой системы». Сведения о природе самого осциллятора отсутствуют. Бюннинг предполагает, что у растений значительную часть механизма биологических, или, как он их называет, «физиологических часов» составляет пигментная система, обратимо изменяющаяся при действии красного и инфракрасного света. Вопрос о связи этих изменений с суточным режимом митозов у растений не исследовался.

В последнее время значительное развитие получило биохимическое направление исследования природы «биологических часов», главным образом благодаря работам Гастингса и Суини (Hastings a. Sweeney, 1958, 1960; Hastings, 1959, 1960, 1962; Sweeney a. Hastings, 1960; Sweeney, 1960, 1963; Hastings a. Bode, 1962, и др.), выполненным на одноклеточных с применением различных ингибиторов метаболических процессов. Воздействуя на жгутиконосца Gonyaulax актиномицином *D*, избирательно блокирующим ДНК-зависимый синтез РНК (см. гл. I, раздел 2, а также гл. VI, раздел 3), Каракашьян и Гастингс (Karakashian a. Hastings, 1962) сумели подавить суточную периодичность биолюминесценции, не нарушая роста культуры. В то же время применение антиметаболитов ДНК (аметоптерина и 5-фтордезоксиуридина), нарушавших ее синтез, но не действовавших на уже синтезированные молекулы, задерживало рост объекта, не оказывая влияния на суточный ритм. Авторы сделали вывод о сигнализации времени путем образования в клетке новых и-РНК. Однако эти данные шли вразрез с результатами более ранних опытов, выполненных в той же лаборатории (Sweeney a. Hayo, 1961), в которых было показано, что у безъядерных фрагментов Acetabularia сохраняется способность к суточному ритму фотосинтетической активности по крайней мере на пять циклов и что, следовательно, механизм «биологических часов» должен быть заключен в цитоплазме.

Выполнив новое исследование на Gonyaulax с использованием более широкого спектра ингибиторов отдельных звеньев биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, Каракашьян и Гастингс (Karakashian a. Hastings, 1963) обнаружили в клеточном цикле объекта период повышенной чувствительности к ингибиторам ДНК-зависимого синтеза РНК, совпадающий с периодом повышенной светочувствительности, из чего был сделан вывод о том, что у Gonyaulax периодически происходит синтез РНК, «заводящей часы». Они приходят к общему заключению, что часовой механизм ритмов в целом зависит от способности клеток синтезировать РНК, но что в определении ритмической функции не обязательно должна участвовать вновь синтезируемая и-РНК. Вполне вероятно, что этот процесс детерминирован более стабильными формами РНК цитоплазмы, как, например, у Acetabularia.

Эти данные представляют интерес в свете недавних исследований Спирина и др. (1964), показавших, что последовательность прохождения стадий развития вьюна обеспечивается периодичностью «репрограммирования» рибосом, а не РНК-синтезирующей активностью ядер, как это предполагалось ранее (см. гл. II, раздел 6). Если этот принцип распространяется и на определение биологических процессов, которые можно отнести к категории ритмических, то становится понятной значительная устойчивость врожденных ритмов к воздействиям.

Существует мнение о том, что независимо от присутствия встроенных (built-in) часов организм продолжает получать информацию о периодических изменениях в окружающей среде при любых условиях изоляции. На основании ряда наблюдений Браун (Brown, 1959) предполагает, что источником такой информации могут быть сигналы, связанные с действием космической радиации.

По-видимому, одним из подходов к изучению механизма «биологических часов», задающих ритм митозов, является установление элементарных процессов (вплоть до отдельных звеньев реакций), ответственных за ассоциацию и диссоциацию внешней и внутренней периодичности процессов. До сих пор неизвестно, например, с чем связано появление в определенный момент зависимости суточного ритма митозов от внешних условий при переходе от эмбриогенеза к постнатальному развитию, и, наоборот, что сопутствует утрате отдельными тканями способности к суточной периодичности клеточных делений при малигнизации (Blumenfeld, 1943; Гололобова, 1958, 1962; Marini a. Brogi, 1960; Bertalanffy, 1962, 1963a, b; Bertalanffy a. McAskill, 1964).

В плане исследования этих вопросов большое значение приобретают сведения о превращениях, происходящих на протяжении суток в митотическом цикле клеток. Важно знать, на каком этапе митотического цикла в клетках наступают изменения,

обусловливающие суточную синхронизацию делений. Еще раньше было известно, что периодическому повышению числа клеточных делений в тканях на протяжении суток всегда предшествует нарастание количества ДНК в клетке (Barnum, Jardetzky a. F. Halberg, 1958). С развитием метода радиоавтографии было установлено, что синтез ДНК также подвержен суточному ритму (Messier a. Leblond, 1960; Ritchie, Frei a. Shinozuka, 1963; Чумак, 1963 б; Horvàth, 1963; Frei a. Ritchie, 1964). При этом, как показали Пильгрим, Эрб и Маурер (Pilgrim, Erb u. Maurer, 1963), интенсивность синтеза ДНК на протяжении суток не изменяется; точно так же не нарушается прохождение клетками премитотического периода G_2, как этого следовало бы ожидать, если бы единственным фактором, ответственным за суточную периодичность митозов, являлся адреналин. По данным Пильгрима и Маурера, полученным при исследовании различных тканей мыши (эпителий пищевода, языка, преджелудка, эпидермис кожи живота) методом радиоавтографии, на протяжении суток происходит синхронизация клеток в S-периоде вследствие временного возникновения в митотическом цикле блока $S—G_2$ (см. гл. II, раздел 3). После снятия блока клетки быстро проходят период G_2 и затем синхронно вступают в митоз. Что является причиной задержки клеток в S-периоде, остается пока неисследованным.

2. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ В УСЛОВИЯХ АДАПТАЦИОННОГО СИНДРОМА

Понятие об адаптационном синдроме. Участие гормонов в регуляции митотического режима организма отчетливо выявляется в условиях так называемого адаптационного синдрома, представляющего собой совокупность характерных стереотипных защитных реакций организма в ответ на раздражители различной природы. Автор концепции об адаптационном синдроме Ганс Селье (Selye, 1936, 1950, 1952, 1954, 1956, 1958 и др.) положил в ее основу представление о двух типах реакций организма на воздействия: а) специфическом (образование антител в ответ на введение антигенов, привыкание к наркотикам и т. д.) и б) неспецифическом, предполагающем стереотипный ответ на огромный спектр разнообразных воздействий. В последнем случае в организме развивается особое состояние — напряжение, или стресс (stress). Селье определяет стресс как «состояние, проявляющееся в виде специфического синдрома, который включает в себя все неспецифические изменения в биологической системе». Факторы, вызывающие это состояние, получили название стрессоров. Стрессорами могут являться звуковые, механические и электрические раздражения, болевые воздействия (ожог, укол и т. д.), хирургическое повре-

ждение, чрезмерные мышечные упражнения, холод, голодание, интоксикация сублетальными дозами ядов (формалина, гистамина, адреналина, атропина и др.) и т. д.

Адаптационный синдром протекает в несколько характерных стадий. Первая из них (6—48 час. после воздействия) носит название реакции тревоги и подразделяется в свою очередь на две фазы: шока и контршока. Во время шока в организме происходят сдвиги, которые Селье обозначает как основную триаду изменений: 1) значительное увеличение коркового слоя надпочечников, сопровождающееся исчезновением из клеток секреторных гранул липоидов и хромаффинных веществ, главным образом в пучковой зоне (место образования глюкокортикоидов); 2) острая инволюция тимико-лимфатического аппарата (зобной железы, селезенки, лимфатических узлов и отчасти печени); 3) появление кровоточащих язв в пищеварительном канале (главным образом в желудке и двенадцатиперстной кишке). В фазе контршока происходит ослабление этих явлений.

За реакцией тревоги следует стадия устойчивости, переходящая при благоприятных условиях в стадию восстановления, а при неблагоприятных — в стадию истощения, заканчивающуюся, как правило, гибелью организма.

Роль гормонов в развитии адаптационного синдрома. Большую роль в развитии адаптационного синдрома играют сдвиги в системе гормонов и в первую очередь изменения секреции гормонов адреналового комплекса (см. гл. I, раздел 2). Уже в ранних работах Селье было отмечено, что у гипофизэктомированных животных отсутствуют основные проявления реакции стресса. Позднее другими авторами (Sydnor a. Sayers, 1954, и др.) было показано, что через несколько минут после воздействия стрессора в крови обнаруживается повышенное содержание АКТГ. Следствием этого является усиленное образование и поступление в кровь гормонов коры надпочечников (см. Skelton a. Hyde, 1961; Grosjean a. Lemaire, 1962; Simler et al., 1962; Thiessen a. Nealey, 1962, и др.), преимущественно глюкокортикоидов, которым принадлежит в организме адаптивная роль; без их участия защитно-приспособительные возможности организма не могут быть реализованы (см. Нейман, 1963). Введением АКТГ можно экспериментально вызвать симптомы стресса. Повышение концентрации кортикостероидов в периферической крови в свою очередь ослабляет и может полностью снять усиление секреции АКТГ при действии сильных раздражителей (Ueno, 1957a, b; Barrett, 1961; Endröczi et al., 1961; Hess et al., 1961), что обеспечивает равновесие в цепи регулирования и предотвращает возникновение так называемых болезней адаптации (Селье, 1952).

Быстрота мобилизации АКТГ гипофизом (первые изменения могут быть обнаружены в пределах нескольких секунд) свидетельствует о нервной регуляции этого процесса. Действительно,

многочисленными опытами было показано участие гипоталамуса в механизме выделения АКТГ (Long, 1947; Ganong a. Hume, 1954; см. также Генес, 1953, 1957; Алешин, 1959, и др.). Вопрос о том, какая область гипоталамуса ответственна за выделение АКТГ, в настоящее время является спорным. Эскин (1960) полагает, что различные стрессоры могут стимулировать различные участки гипоталамуса. В регуляции секреции АКТГ принимают участие также ретикулярная формация (Anderson, Bates et al., 1957; Бунцер, 1964) и высшие отделы центральной нервной системы (Porter, 1954; Ohler a. Sevy, 1956; Михайлова, 1956, и др.).

Начальный импульс при стрессе до сих пор не установлен. Однако ряд экспериментальных данных (Saffran a. Schally, 1955; Эскин, 1956; Утевский и др., 1959; Roels a. Lagasse, 1961; Verwoerd-Verhoef a. Verwoerd, 1962) указывает на важную роль симпатомиметических аминов — адреналина и норадреналина — в механизме выделения АКТГ при стрессе. Есть основания думать, что они мобилизуют гипоталамус для стимуляции образования и секреции АКТГ (Эскин, 1960). Таким образом, в настоящее время вырисовывается следующая цепь событий, обусловливающих адаптационный синдром: стрессор — мозговой слой надпочечников (рефлекторная стимуляция секреции адреналина) — ретикулярная формация (?) — гипоталамус — передняя доля гипофиза (АКТГ) — кора надпочечников (глюкокортикоиды и в меньшей степени минералкортикоиды).

Наряду с этими основными факторами в адаптационный синдром вовлекаются и другие гормоны. В осуществлении связи между гипоталамусом и гипофизом при стрессе большую роль приписывают антидиуретическому гормону задней доли гипофиза — вазопрессину (Martini a. Morpurgo, 1955; Martini a. de Poli; 1956; Schapiro et al., 1958; Войткевич, 1960, и др.). Однако Эскин (1960) приводит данные, указывающие на то, что, хотя вазопрессин и выделяется при стрессе в значительных количествах, его роль состоит не в стимуляции секреции АКТГ, а во временном угнетении функции щитовидной железы, выражающемся в снижении ее способности поглощать радиоактивный йод (Скебельская, 1956, 1963; Скебельская и Баграмян, 1962). Большое значение в осуществлении реакции стресса Селье придает соматотропному гормону гипофиза (СТГ), или гормону роста. Он полагает, что СТГ уравновешивает действие АКТГ и что конечный исход адаптационного синдрома во многом зависит от соотношения этих двух гормонов.

Эстрогены в условиях адаптационного синдрома. Еще Селье (Selye, 1952, и др.) отмечал, что стрессоры вызывают, как правило, снижение секреции гонадотропных гормонов: фолликулостимулирующего, лютеинизирующего и пролактина, а тем самым — и угнетение функции яичников. Последующие исследова-

ния подтвердили эти наблюдения. Значительные расстройства вплоть до полного прекращения эстральных циклов удавалось наблюдать при действии различных стрессоров: в условиях нервного шока (Павлова, 1955); возбуждения, вызванного присутствием самцов (Whitten, 1958, 1959); яркого освещения, шума и др. (Grönroos a. Kauppila, 1959). Серьезные нарушения в протекании эстральных циклов происходят также при экзогенном введении в организм гормонов адреналового комплекса, секреция которых усиливается в состоянии стресса: адреналина (Эскин, 1941; Воронина, 1948), АКТГ (Эскин, 1955), кортикостероидов (Donnet, Chevalier, Duflot et Jacquin, 1960; Donnet, Chevalier et Pruneyre, 1960; Nallar, 1961a, b).

Эти данные находят подтверждение при исследовании действия гормонов адреналового комплекса на эстрогенную стимуляцию органов воспроизводящей системы. Так, например, адреналин вызывает уже через 40 мин. после введения снижение уровня макроэргических фосфатных соединений, в частности АТФ, в матке крыс, получавших эстрадиол-бензоат (Gautheron et al., 1956, 1957, 1958). В других опытах (Leonard, 1962) введение крысам адреналина через 48 час. после инъекции эстрадиол-бензоата оказывало в течение 5 мин. угнетающее действие на фосфорилазную активность и уровень гликогена в матке.

В ряде работ были обнаружены подобные же отношения между действием эстрогенов, с одной стороны, АКТГ и кортикостероидов — с другой (W. S. Bullough, 1952b, и др.). Было показано, что АКТГ подавляет реакцию обводнения тканей матки в ответ на введение эстрогенов, а гидрокортизон — гликолитическую активность матки, стимулированную эстрогенами (Roberts a. Szego, 1953); такое же действие оказывает кортизол (Spaziani a. Szego, 1958; Spaziani, 1962). В опытах Велардо (Velardo, 1957a, b) кортикостероиды тормозили развитие децидуальной ткани у мышей с ложной беременностью.

Все перечисленные данные позволяют сделать вывод об угнетении функциональной активности эстрогенов при развитии адаптационного синдрома. В то же время известно (Selye, 1952; Astwood, 1957), что сами эстрогены в определенных условиях (например, при повторном введении) могут являться стрессорами. Имеются данные о стимулирующем действии эстрогенов на функцию надпочечников in vivo (W. S. Bullough, 1952b; Charollais et al., 1957; F. Halberg a. Haus, 1960; Mandl, 1962; Nicola et al., 1962; Yamashita, 1963) и in vitro (Kitay, 1961; Юдаев и Микоша, 1963; Микоша, 1964, и др.). Отмечено также возрастание секреции АКТГ и кортикостероидов во время эструса (Deschiens a. Bénex, 1959; Brañez a. Roels, 1961, и др.). Эти факты не противоречат результатам вышеизложенных работ. Когда эстрогены выступают как стрессоры и активируют деятельность гормонов адреналового комплекса, то равновесие

системы может быть достигнуто только в том случае, если последние (по принципу отрицательной обратной связи) действуют угнетающим образом на первоначальный раздражитель подобно тому, как это происходит при регулировании уровня сахара в крови (см. рис. 4). Отсюда понятна необходимость наличия в организме механизмов, в силу которых функция эстрогенов может быть подавлена в условиях адаптационного синдрома. Не исключено, что именно этим объясняется широко распространенное мнение о существовании «антагонизма» между эстрогенами и кортикостероидами (Roberts a. Szego, 1953; McKerns, 1957, 1962, 1963a; Leonard, 1958, 1962; McKerns a. Bell 1960; Edgren a. Calhoun, 1959, 1961; Edgren, 1961, и др.), хотя эстрогены и проявляют себя как активаторы гормонов адреналового комплекса (см. выше). Правда, эстрогены способны стимулировать функцию надпочечников, по-видимому, лишь в определенных пределах.

Так, Хольцбауэр (Holzbauer, 1957) показала, что эстрогены усиливают секрецию кортикостероидов надпочечниками только в нормальных условиях и, наоборот, подавляют ее, когда надпочечники находятся в состоянии максимальной секреции при стрессе. Эти данные, являющиеся хорошим подтверждением правила «исходного состояния» Вильдера — Лейтеса (см гл. I, раздел 2), объясняют вместе с тем, почему эстрогены в некоторых случаях способствуют приспособлению организма к состоянию стресса (Noak u. Schwartze, 1959; Юдаев и др., 1964).

Действие стрессоров на деление клеток. Реактивное торможение митозов. Подавляющее большинство выполненных в этом плане работ посвящено изучению митотического режима в ранние сроки после воздействия стрессора на организм, то есть во время реакции тревоги.

Навилль (Naville) еще в 1936 г. наблюдал, что фиксация лягушек во время опыта приводит к уменьшению числа митозов в эпителии роговицы. В 1944 г. Фриденвальд и Бушке (Friedenwald a. Buschke) обнаружили резкое снижение митотической активности в эпителии роговицы крыс в результате возбуждения, связанного с постановкой опыта, а также при болевом воздействии. Предположив, что это снижение вызвано действием выделяемого при возбуждении адреналина, Фриденвальд и Бушке провели серию опытов с экзогенным введением крысам адреналина и успешно воспроизвели феномен торможения митозов: достоверное снижение числа клеточных делений в эпителии роговицы имело место, как и в опытах с действием неспецифических раздражителей, через 40—60 мин. после инъекции адреналина; через 2 часа число митозов падало почти до нуля, а затем начиналось восстановление. Буллоу и др. (W. S. Bullough a. Green, 1949; Green a. W. S. Bullough, 1950; W. S. Bullough, 1952a, 1955a) получили аналогичные резуль-

таты, исследовав влияние шока, механического раздражения, адреналина и глюкокортикоидов на митотическую активность эпидермиса уха мыши; во всех случаях наблюдалось быстрое снижение числа митозов не менее чем на 60%.

Это явление, получившее название реактивного торможения митозов (см. Стрелин и Козлов, 1959), было в дальнейшем всесторонне изучено на различных моделях. Резкое падение митотической активности в эпителии роговицы мышей с последующим восстановлением было обнаружено при действии звуковых раздражителей (Уткин, 1963б; О Чжэн, 1954), при болевых воздействиях и раздражении животных электрическим током (Козлов, 1953, 1954а, б, 1959а; Стрелин и др., 1954; Залкинд, 1954б; Алов, 1955а, б; Рябуха, 1955, 1958а, б; О Чжэн, 1955; Суворова, 1955, 1956а, б; Уткин и Косиченко, 1955, 1956б; Стрелин и Суворова, 1956, и др.), в состоянии испуга (Gyergyay a. Hadnagy, 1957b), при охлаждении животных (Уткин и Мовчан, 1963) и других воздействиях.

Наибольшее количество работ в этом направлении было выполнено в лаборатории Стрелина. Его сотрудниками было показано, что реактивное торможение митозов при 2-часовом раздражении крыс электрическим током наступает не только в эпителии роговицы, но также в эпидермисе кожи уха и хвоста, в эпителии пищевода и корковом слое надпочечников (О Чжэн, 1955) и даже в привитой подкожно аденокарциноме Эрлиха (Козлов, 1954а, 1955), но не наблюдается в эпителии кишечника и в зобной железе (О Чжэн, 1955). В опытах Суворовой (1955, 1956а, б) было установлено, что способностью к реактивному торможению митозов в ответ на раздражение электрическим током обладают, кроме мышей и крыс, также кролики и кошки, однако лишь во взрослом состоянии. Попытки получить реакцию торможения митозов при воздействии стрессором или при введении адреналина у новорожденных мышей и кроликов, а также у лягушек и кур не увенчались успехом, из чего, по мнению автора, можно сделать вывод о возникновении этой способности лишь на поздних этапах онто- и филогенеза. Исключением из этого правила является морская свинка, не реагирующая снижением числа митозов в эпителии роговицы ни на болевые воздействия, ни на адреналин; как уже отмечалось, в эпителии роговицы морских свинок отсутствует и суточный ритм митотической активности (см. предыдущий раздел).

В лаборатории Уткина (Уткин и Косиченко, 1956а; Уткин, 1958, и др.) был обнаружен феномен чрезвычайно высокой чувствительности митотического режима эпителия роговицы мышей и крыс к любым, казалось бы, несущественным изменениям в окружающей среде. Оказалось, что сдвиги в митотической активности могут быть вызваны такими воздействиями, как удаление животных из клетки, пересадка их в новую клетку,

перестановка клетки в новое помещение, травмирование животных, находящихся по соседству, и т. п. Этот феномен, названный Уткиным реакцией на новизну обстановки, получил впоследствии подтверждение (Steinberg a. Watson, 1960, и др.) и широко учитывается в настоящее время при проведении опытов по изучению митотической активности у животных, для которых необходима предельная стандартизация условий содержания (см. W. S. Bullough a. Laurence, 1961a).

Роль адреналина в развитии реактивного торможения митозов. Как уже было сказано, введение адреналина оказывает такое же действие на режим митозов, как и различные внешние раздражители, что полностью согласуется с представлениями о его «пусковой» роли в начальных фазах развития адаптационного синдрома. Временное угнетение митотической активности под влиянием адреналина наблюдали, кроме уже упомянутых авторов, Алов и др. (1955), Алов (1956), Захаров (1956, 1958), Рябуха (1956, 1958б), Chaudry et al. (1956a), Богоявленская и Доброхотов (1958), Доброхотов (1959б), Козлов (1959б), Царева (1960) и другие. Однако чувствительность различных тканей к адреналину оказалась неодинаковой. У мышей и крыс наиболее сильное торможение клеточного деления в ответ на введение адреналина наблюдается в эпителии роговицы, эпителии языка и эпидермисе уха (Алов и др., 1955; О Чжэн, 1955, и др.).

Данные о действии адреналина на митозы кишечного эпителия противоречивы. Богоявленская и Доброхотов (1958) при исследовании участка тощей кишки крыс наблюдали снижение числа митозов в эпителии до 25,9% по сравнению с 42,2% в контроле, но оно оказалось недостоверным. Как уже было сказано, О Чжэн (1955) не смог выявить торможения митотической активности в эпителии двенадцатиперстной кишки при раздражении крыс электрическим током, хотя и в его опытах отмечалось снижение числа митозов в кишечнике на 14 и 20%. Между тем Алов и др. (1955) на мышах, Семенов и др. (1961) на крысах наблюдали достоверное уменьшение митотического индекса в эпителии двенадцатиперстной кишки в течение 1—3 час. после введения адреналина.

Это противоречие отчасти было снято после опубликования работы Буллоу и Лоуренс (W. S. Bullough a. Laurence, 1961a, b), показавших на примере эпидермиса уха мыши, что адреналин препятствует не всей подготовке клеток к делению, а блокирует лишь последний этап, предшествующий митозу; параллельно с этим появился ряд исследований (Quastler o. Sherman, 1959; Lesher et al., 1961), в которых было определено, что продолжительность премитотического периода в эпителии различных отделов кишечника мышей составляет не более 1—1,5 час. Опираясь на эти данные и учитывая быструю инактивацию

адреналина в организме животных, мы исследовали его действие на митозы эпителия двенадцатиперстной кишки мышей через короткое время после введения при частых сроках фиксации материала (Епифанова и Чумак, 1963). В двух опытах с использованием различных доз адреналина уже через 20 мин. после его введения наблюдалось достоверное снижение митотической активности, продолжавшееся в пределах одного часа. Подсчет процентного соотношения фаз митозов через 10, 20, 30 мин. и далее после введения адреналина позволил сделать вывод, что в эпителии кишечника, как и в эпидермисе уха, адреналин блокирует главным образом премитотический период, не препятствуя всей предшествующей подготовке клеток к делению. Об этом свидетельствует быстрое восстановление митотического индекса, величина которого по окончании действия адреналина становится даже выше, чем в контроле.

В литературе имеются указания на повышение числа митозов в эпителии кишечника при нанесении животным сильных болевых раздражений: ожога участка кожи (Klein, 1951), перерезки седалищного нерва (Бляхер, Воронцова и Райцина, 1957; Райцина, 1963), отрезания кончика языка (Жинкин, 1960). К сожалению, в этих работах не были исследованы ранние сроки после нанесения воздействий. В опытах Жинкина достоверное увеличение митотического индекса в эпителии тощей кишки крыс наблюдалось через 1 час после операции и достигало максимума через 2 часа, а после 4 час. наступало восстановление. Райцина исследовала митотическую активность эпителия тонкого кишечника крыс только на одном сроке — через 40 мин. после перерезки седалищного нерва. Вполне возможно, что при действии сильных стрессоров в эпителии кишечника развивается глубокое и быстро проходящее торможение митотической активности, сменяющееся более постепенным ее подъемом, который ошибочно принимается за первоначальную стимуляцию.

В уже упоминавшихся работах Буллоу и Лоуренс обнаружено значительное подавление митотической активности эпидермиса уха мыши в состоянии стресса, вызванного 40-часовым голоданием. При инкубации кусочков уха, взятых у таких мышей в момент наибольшего торможения митотической активности, в эпидермисе уже в течение первого часа наблюдается резкий подъем числа митозов, в три раза превышающий максимальную величину митотического индекса этой ткани в обычных условиях инкубации. Более того, аналогичный подъем митотической активности эпидермиса, взятого у мышей в состоянии стресса, имел место и при инкубации кусочков уха в атмосфере чистого азота, когда число митозов обычно бывает минимальным. Сходная картина была получена в опытах с предварительным введением мышам адреналина и последующим отмыванием его из тканей уха при инкубации. Эти данные

привели Буллоу и Лоуренс к представлениям о решающей роли адреналина в развитии феномена торможения митозов при стрессе (см. также взгляды Буллоу на природу суточного ритма митозов в предыдущем разделе). Вместе с тем полученные результаты послужили основанием для характеристики адреналина как премитотического ингибитора, после прекращения действия которого клетки, накопившиеся в премитотическом периоде, одновременно вступают в митоз, что и обусловливает подъем митотической активности. В отношении таких тканей, как эпителий роговицы, эпидермис уха, эпителий языка, и некоторых других этот принцип действия адреналина, по-видимому, не вызывает сомнений.

Что касается эпителия кишечника, то пока достоверно установлены только количественные различия в его реакции на стрессоры по сравнению с вышеупомянутыми тканями: так, например, число митозов в эпителии кишечника при действии адреналина редко снижается более чем на 30—40%, в то время как в эпителии роговицы оно падает иногда почти до нуля; кроме того, феномен торможения и восстановления митозов при стрессе развивается в эпителии кишечника, по всей вероятности, в более короткие сроки, чем в эпителии роговицы. Не исключены, разумеется, и другие отличия, которые могут быть связаны в значительной степени с особенностями митотических циклов этих тканей. Однако в настоящее время вряд ли имеются основания оспаривать в принципе способность эпителия кишечника отвечать на действие стрессоров реактивным торможением митозов. В опытах Зорина (1962), где состояние стресса достигалось повторным введением крысам 10%-ного формалина (по Селье), в эпителии кишечника в момент наибольшего проявления симптомов реакции тревоги наблюдалось значительное снижение числа митозов.

Из всего изложенного следует, что адреналину принадлежит важная роль в возникновении реактивного торможения митозов при адаптационном синдроме. Однако он не является единственным ингибитором клеточного размножения в организме.

Роль гормонов гипофиза и коры надпочечников в развитии реактивного торможения митозов. Как уже было сказано, в развитие адаптационного синдрома последовательно вовлекаются различные системы органов, в первую очередь гипофиз и кора надпочечников. Этим объясняется большое количество работ, посвященных изучению их роли в феномене реактивного торможения митозов.

Было показано, что введение животным кортикостероидов (как глюко-, так и минералкортикоидов) вызывает, как правило, торможение митотической активности (Green a. Ghadially, 1951; Green a. Savigear, 1951; W. S. Bullough, 1952b; Roberts et al., 1952; Teir a. Isotalo, 1953, 1954; Teir a. Ravanti, 1953;

Isotalo a. Teir, 1953; Cameron, 1955; Robbins et al., 1955; Алов, 1955a, 1957a; Chaudry et al., 1956b, c; Ghadially a. Green, 1957, и др.), однако характер этого торможения неодинаков в различных органах, и эффект в большой степени зависит от дозы вводимого гормона. Так, например, малые дозы преднизолона (0,3 *мг*) стимулируют митотическую активность эпидермиса кожи живота и слизистой оболочки желудка крыс, и лишь начиная с дозы 1,0 *мг*, развивается торможение митозов, прогрессирующее с увеличением дозы (Räsänen, 1962). По данным Алова (1955a, 1957a), однократное введение мышам кортизона не изменяет интенсивности клеточного деления в эпидермисе, эпителии роговицы, языка, пищевода и кишечника, однако в этих же условиях наблюдается резкое угнетение размножения лимфоцитов в лимфатических узлах и особенно в зобной железе. Повторное введение кортизона (пять инъекций) приводит к инволюции лимфоидных органов и к снижению митотической активности в эктодермальных эпителиях (роговицы и эпидермиса), которые проявляют бóльшую чувствительность к кортизону, чем энтодермальные эпителии (языка, пищевода и кишечника).

Удаление надпочечников обычно приводит к повышению уровня митотической активности в организме (W. S. Bullough, 1952b; Ebling, 1955; Ghadially a. Green, 1957; Рябуха, 1958б; Teir a. Carpin, 1959; Mizuno a. Masahito, 1961, и др.). В опытах Рябухи крысы, лишенные надпочечников, не реагировали на болевое раздражение снижением числа митозов в эпителии роговицы. По данным Хемингуэя и сотрудников (Hemingway, 1960, 1961; Hemingway a. Howard, 1961), адреналэктомия в два раза увеличивает митотический индекс в регенерирующей печени крыс; при облучении таких животных в дозе 200 *р* высокий уровень митозов в печени сохраняется.

Митотическую активность самих надпочечников при стрессе подробно исследовал Прилуцкий (1962), наблюдавший у крыс значительное уменьшение числа делящихся клеток во всех зонах коркового слоя на протяжении реакции тревоги, то есть во время наибольшей секреторной деятельности железы. На третьи сутки опыта (восстановительный период) митотический индекс в клубочковой и наружной пучковой зонах был много выше, чем у контрольных животных. Эти результаты согласуются с данными биохимических исследований (Farese a. Reddy, 1963), в которых было показано, что введение крысам АКТГ вызывает быстрое нарастание количества РНК и белков в надпочечниках, сопровождающееся увеличением их веса, а ДНК начинает синтезироваться лишь на пятый день опыта. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что введение АКТГ приводит сначала к гипертрофии надпочечников и лишь во вторую очередь к увеличению числа клеточных элементов, что подтверждает результаты более ранних работ (Cater a. Stack-Dun-

ne, 1955) и полностью согласуется с представлениями о роли надпочечников в развитии адаптационного синдрома. В свете этих данных становится понятным, почему на 12-й день после введения крысам АКТГ у них наблюдается стимуляция митозов в слизистой желудка и эпидермисе кожи живота (Räsänen a. Teir, 1961; Räsänen, 1963). Этот срок исследования совпадает с максимумом синтеза ДНК и с периодом минимальной секреторной активности клеток коры надпочечников при введении АКТГ; наблюдаемый подъем митотической активности, по-видимому, обусловлен прекращением поступления в кровь глюкокортикоидов после их усиленного выделения надпочечниками в более ранние сроки после введения АКТГ. Это подтверждается тем, что в условиях адреналэктомии АКТГ не оказывает действия на деление клеток в тех же органах.

Гипофизэктомия в большинстве случаев также приводит к снижению уровня митотической активности в организме (Leblond a. Carriere, 1955, и др.), однако в меньшей степени, чем адреналэктомия (Ebling, 1955; Teir a. Carpin, 1959), и не во всех органах в равной мере (Артемьева, Бабаева, Лиознер и др., 1960; Райцина, 1961; Лиознер и др., 1962). Наибольшее угнетение клеточного размножения у крыс в отсутствие гипофиза наблюдается в органах с низким уровнем обновления (физиологической регенерации), таких, как печень, почка, орбитальная железа (Лиознер и др., 1962), в то время как на митотической активности эпителия роговицы, языка и кишечника гипофизэктомия отражается мало. На основании этих данных пока трудно высказать определенное суждение об участии гормонов гипофиза в регуляции митотического режима при стрессе, так как удаление гипофиза выключает сразу целый комплекс гормонов, в том числе и соматотропный гормон (СТГ), уравновешивающий по Селье действие АКТГ.

Интересно, что у гипофизэктомированных крыс Райцина (1963) не наблюдала повышения митотического индекса в эпителии кишечника крыс через 40 мин. после перерезки седалищного нерва; наоборот, в этих условиях происходило достоверное снижение митотической активности, что можно объяснить более медленным течением процесса реактивного торможения митозов в кишечнике гипофизэктомированных крыс. У нормальных крыс через 40 мин. после перерезки седалищного нерва в эпителии кишечника наблюдаются уже восстановительные процессы и реактивное торможение митозов не улавливается на данном сроке исследования. В отличие от кишечника, реактивное торможение митозов в эпителии роговицы при том же болевом воздействии отчетливо обнаруживалось как у нормальных, так и у гипофизэктомированных крыс (Райцина и Кашинцева, 1963). Это говорит о прямом участии адреналина в реактивном торможении митозов эпителия роговицы при стрессе.

Для других органов, где главная роль в подавлении митотической активности принадлежит кортикостероидам (например, для тимико-лимфатической системы), наличие гипофиза для проявления феномена реактивного торможения митозов является, по-видимому, непременным условием.

Роль других гормональных факторов в митотическом режиме при стрессе. Как уже говорилось, щитовидная железа испытывает угнетение в процессе развития адаптационного синдрома, что также отражается на митотическом режиме организма. В опытах Алова (1955б, 1957а) и Эповой (1957, 1959) введение молодым мышам тиреоидина вызывало повышение митотической активности в эпителии роговицы, языка, кожи и кишечника, в то время как удаление щитовидной железы или выключение ее функции метилтиоурацилом приводило к снижению числа делящихся клеток. Романов и др. (1962) наблюдали стимулирующее влияние тиреоидного гормона на деление клеток в щитовидной железе, различных зонах надпочечников, печени, паращитовидных желез и др. Отсюда следует, что подавление функции щитовидной железы в условиях адаптационного синдрома способствует поддержанию общего низкого уровня митотической активности в организме.

Вопрос о взаимодействии гормонов адреналового комплекса с эстрогенами был подробно разобран выше. Роли эстрогенов в регуляции митотического режима организма посвящена гл. V книги.

Значение феномена реактивного торможения митозов в условиях нормальной жизнедеятельности организма. Приведенный материал позволяет рассматривать явление реактивного торможения митозов как общую реакцию организма на все виды внешних раздражений. В противоположность этому состояние сна способствует повышению общего уровня митотической активности в организме (W. S. Bullough, 1948а, Залкинд, 1959; Соколова, 1959, 1962). Поскольку реактивное торможение митозов является первичной неспецифической реакцией организма на внешние воздействия, его можно рассматривать как непременную составную часть начальной стадии адаптационного синдрома Селье. Экспериментальные данные показывают, что быстро развивающееся торможение митозов в ответ на действие раздражителей обусловлено теми же факторами, которые вызывают и другие проявления реакции стресса, а именно, рефлекторной стимуляцией выделения адреналина с последующей активацией всего адреналового комплекса.

В тех случаях, когда торможение митозов вызвано непосредственным действием адреналина на ткани, оно, как правило, носит кратковременный характер. Адаптация животных к новым условиям (смена реакции тревоги фазой восстановления) приводит к повышению числа митозов в тканях, поскольку реактивное торможение митозов связано главным образом с задержкой

перехода клеток из интеркинеза в митоз. Устранение неблагоприятных воздействий снимает этот тормоз, и клетки, подготовившиеся к делению, одновременно вступают в митоз.

В процессе развития адаптационного синдрома митотический режим организма подвергается дальнейшим изменениям, варьирующим от органа к органу. Так, в эпителии кишечника вскоре после первичной реакции торможения довольно долгое время (по крайней мере в течение 48 час.) наблюдается повышенное число митозов, в то время как органы тимико-лимфатической системы начинают регрессировать, и деление клеток в них практически прекращается.

Изменения в митотическом режиме организма при стрессе касаются не только перехода клеток из интеркинеза в митоз. Как показал Уткин (1958), факторы новизны, препятствующие возникновению новых делений в эпителии роговицы мышей, вызывают вместе с тем сокращение времени метафазы. Следует, однако, отметить, что это влияние выражено значительно слабее, чем действие на переход клеток из интеркинеза в митоз, и при определении митотического индекса им практически можно пренебречь.

В попытках объяснить причины своеобразия динамики митотического режима организма, обусловливающие, в частности, его большую лабильность, Уткин (1958) предложил гипотезу, в основу которой положил представления Шапота (1952, 1954 и др.) о соотношении пластического и функционального обмена в организме. Согласно взглядам Шапота, существует универсальный, общий для всех клеток механизм (макроэргические фосфорные соединения, воссоздаваемые в процессах сопряженного с окислением или брожением фосфорилирования), который энергетически обеспечивает как элементарные проявления жизнедеятельности (пластический обмен), так и самую возможность осуществления специфических для данных клеток функций (функциональный обмен). Таким образом, энергетические траты в клетке направляются не по одному, а по двум руслам. При этом усиление одного из них может привести к ограничению расхода энергии для другого. Уткин предполагает, что в основе динамики режима делений в организме лежат соотношения в изменении этих двух направлений в обмене веществ. Во время интеркинеза в клетке преобладает пластический обмен. Причину угнетения митозов в периоды повышенной активности животных, а также при действии стрессоров Уткин усматривает в ослаблении пластического и усилении функционального обмена, что может даже способствовать более быстрому завершению делений, хотя возникновение новых митозов при этом заторможено. Эти представления до сих пор не были подвергнуты экспериментальной проверке, однако в настоящее время изучение митотических циклов и процессов, протекающих в интеркинезе, так далеко продвинулось вперед, что наступила реальная возможность проведения подобного рода экспериментов.

Глава IV

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ

Среди многочисленных факторов, контролирующих деление клеток в организме, системе гормонов принадлежит первостепенная роль. Накопленный к настоящему времени экспериментальный материал (частично изложенный в предыдущих главах) позволяет сформулировать некоторые общие положения относительно участия гормонов в регуляции деления клеток.

Гормоны — регуляторы механизмов митоза. Прежде всего необходимо подчеркнуть, что гормоны не являются непременными компонентами механизмов митоза любой клетки. Анализируя процессы регуляции клеточного деления в организме, Суонн (Swann, 1957, 1958) выделяет факторы, обеспечивающие митоз во всех без исключения клетках: синтез биополимеров, в частности удвоение содержания ДНК; наличие материалов, идущих на построение хромосом и веретена; освобождение необходимой для митоза энергии и т. д. Наряду с этим существуют факторы, действующие лишь на некоторые клетки и только в определенное время. К таким факторам Суонн относит гормоны. Играя решающую роль в экономике тех или иных тканей, гормоны способны существенным образом изменять скорость реакций, обеспечивающих подготовку клеток к делению, а в ряде случаев — побуждать к делению новые клетки, регулируя тем самым митотический режим ткани. В значительной степени это относится к так называемым гормонам роста, которые, по последним данным, действуют как индукторы белкового синтеза (см. гл. VI). Все вышеизложенное позволяет охарактеризовать гормоны как регуляторы механизмов деления, или, по Суонну, как механизмы второго порядка, накладывающиеся на первичные механизмы митоза, общие для всех клеток (см. также Lettré, 1961b).

Регуляция деления клеток — проявление общего регуляционного действия гормонов. Регулирующая роль гормонов во взрослом организме заключается главным образом в управлении

отдельными приспособительными функциями (см. Мицкевич, 1957, и др.). Иными словами, гормоны должны поддерживать такой уровень биохимических процессов, который обеспечивал бы функциональную устойчивость организма и его самовоспроизведение при любых изменениях в окружающей среде, то есть способствовал бы сохранению гомеостаза (см. гл. I, раздел 2). Нарушение гормонального баланса неблагоприятно отражается на функционировании отдельных органов и вызывает сдвиги в митотическом режиме организма, нередко приводящие к тяжелым последствиям. Достаточно указать на такой факт, как возникновение очагов злокачественного роста при расстройстве обмена стероидных гормонов.

Контроль, осуществляемый гормонами над клеточным делением, является частным случаем их общего регуляционного действия в организме. Отсюда следует, что при изучении гормональной регуляции деления клеток необходимо отчетливо представлять себе, с каким типом управляющих систем мы сталкиваемся в том или ином случае.

Согласно современным воззрениям, изложенным в разделе 2 гл. I, механизмы регуляции в организме обеспечиваются преимущественно системами с отрицательной обратной связью; существование подобной формы регуляции было экспериментально доказано для эндокринных желез М. М. Завадовским, который назвал ее типом «плюс-минус взаимодействия». Суть концепции Завадовского сформулирована им в двух основных тезисах:

«Если первый орган непосредственно стимулирует развитие функции второго, то этот второй в процессе своего становления, как правило, тормозит, то есть оказывает влияние на первый с обратным знаком:

$$A \underset{-}{\overset{+}{\rightleftarrows}} B$$

и, наоборот,

$$A \underset{+}{\overset{-}{\rightleftarrows}} B,$$

то есть взаимодействующие органы оказывают друг на друга взаимопротиворечивое влияние.

Именно в силу взаимно противоречивого взаимодействия между органами развивающееся тело животного представляет собой саморегулирующуюся систему с высокой степенью устойчивости, так как регуляция, в силу сказанного отношения, присуща не только организму как целому, но и каждому звену в отдельности» (Завадовский, 1941, стр. 79).

Дальнейшие исследования полностью подтвердили справедливость основной идеи Завадовского, послужившей толчком к широкому изучению взаимодействия желез внутренней секреции. В настоящее время общепризнано, что подавляющее большинство гормональных влияний в сформированном организме осуществляется именно по типу отрицательной обратной связи. Это распространяется и на такие весьма сложно регулируемые процессы, как поддержание уровня сахара в крови (см. рис. 4). Имеющийся экспериментальный материал позволяет считать, что при гормональной регуляции деления клеток в сформированном организме также проявляется принцип отрицательной обратной связи.

Примером изменений в митотическом режиме органа, отражающим такого рода регуляцию, может служить увеличение числа митозов в эпителии матки или молочной железы под влиянием эстрогена с последующим снижением при избытке гормона в организме (см. гл. V). Сюда же относится торможение клеточных делений при действии гормонов гипофиза и надпочечников в условиях адаптационного синдрома, о котором шла речь в предыдущей главе.

Для процессов развития и некоторых патологических состояний характерны иные типы связей, которые обусловливают нарастание событий. Это так называемые положительные обратные связи, проявлением действия которых может служить прогрессивное размножение клеток децидуальной ткани во время беременности (процесс развития), а также возникновение очагов усиленной пролиферации при длительном введении больших доз эстрогенов (патологический процесс).

Наконец, в ряде случаев имеются сочетания типов управления. Подробный разбор этих вопросов содержится в обзорах Малиновского (1960) и Вундера (1962).

Уже из краткой характеристики возможных типов гормональной регуляции размножения клеток в организме следует еще одно важное положение — об условности разделения гормонов на стимуляторы и ингибиторы митоза. В ходе дальнейшего изложения этот тезис будет подвергнут более детальному анализу.

2. ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПУТЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ НА МИТОЗ

Гормоны — энергетические регуляторы деления. Первый период систематической разработки вопроса о влиянии гормонов на митотическое деление относится главным образом к сороковым годам и характеризуется накоплением фактического материала: изучается преимущественно феноменологическая сторона — количественные изменения митотической активности

различных органов и тканей при введении гормонов (Nathanson a. Brues, 1941; W. S. Bullough, 1942, 1943, 1946, и др.; H. F. Bullough, 1943, 1947; Hunt, 1947; Smelser, 1947; Stein a. E. Allen, 1948; Goldsmith et al., 1948, 1949; Montagna et al., 1949, и др.).

В 1946 г. Буллоу (W. S. Bullough, 1946) выступил с концепцией об эстрогенах как «всеобщих митотических стимуляторах» (см. следующий раздел), не получившей, однако, поддержки у других исследователей. Постепенно все резче стала намечаться генденция подразделять гормоны на стимуляторы и ингибиторы клеточного деления, но и в этом вопросе противоречивость фактов не позволяла прийти к окончательному суждению.

Второй период разработки вопроса относится к пятидесятым годам и характеризуется попытками установить уже отдельные звенья гормональной регуляции митоза. В 1951 г. Буллоу и Джонсон (W. S. Bullough a. M. Johnson, 1951b) разработали оригинальный метод кратковременной инкубации кусочков уха мыши, позволяющий изучать условия возникновения и протекания митозов in vitro. С помощью этого метода им удалось установить существование определенной зависимости между содержанием в среде глюкозы, внутриклеточным потреблением кислорода и количеством возникающих в ткани митозов (W. S. Bullough a. M. Johnson, 1951a, c). Был сделан вывод о том, что основным энергетическим источником деления клеток является глюкоза, подвергающаяся аэробному или гликолитическому расщеплению (W. S. Bullough, 1952c). Добавляя в среду гормоны, можно воздействовать на деление клеток, активируя или, наоборот, угнетая глюкокиназную реакцию, являющуюся «узким местом» углеводного обмена. Таким образом, стимулирующее или тормозящее действие гормонов на митозы связано с одной ключевой ферментативной реакцией и осуществляется путем усиления или ослабления притока энергии в «антефазе» — критическом периоде перед видимой профазой, во время которого аккумулируется необходимая для митоза энергия (W. S. Bullough, 1953, 1955b).

Концепция Суонна о гормонах как индукторах клеточного деления. Взгляды Буллоу подверглись подробному критическому рассмотрению в обзоре Суонна (Swann, 1958). Анализ работ различных исследователей, изучавших влияние гормонов на митотическую активность в организме, позволил Суонну обнаружить определенную зависимость между тремя показателями: латентным периодом действия гормона, увеличением числа митозов и наличием клеточной гипертрофии. Эта зависимость может быть проиллюстрирована на примере стимулирующего действия гормона на деление клеток в тканях с высокой и низкой митотической активностью (табл. 3).

В случае действия гормона in vivo на ткань с высокой митотической активностью латентный период, как правило, неве-

Таблица 3

Действие гормонов на деление клеток в тканях с высокой и низкой митотической активностью
(по Суонну, 1958)

Митотическая активность ткани	Латентный период действия гормона, часы	Увеличение числа митозов	Гипертрофия клеток
Высокая	6— 8	2—3	Нет
Низкая	24—48	10—100	Есть

лик, число митозов возрастает незначительно, и гипертрофии клеток не наблюдается. При действии той же дозы гормона на ткань с низкой митотической активностью, включающей в себя большое количество дифференцированных клеток, латентный период резко увеличивается, митотический индекс возрастает в десятки и даже сотни раз, что обычно сопровождается гипертрофией клеток.

Чем обусловлено такое различие? Суонн предлагает следующее объяснение наблюдаемым фактам. В любой ткани с высокой митотической активностью всегда имеется большой процент клеток, уже завершивших подготовку к митозу. Такие клетки действительно нуждаются лишь в притоке энергии для деления. Для этого не нужен длительный латентный период, и размах ответа соответственно невелик. В ткани же с низкой митотической активностью длительный латентный период нужен для того, чтобы успел произойти синтез белков и нуклеиновых кислот, идущих на построение митотического аппарата. Этот процесс связан с увеличением размеров клетки, а резкое возрастание митотического индекса является следствием одновременного вступления в митоз многих клеток.

Оценивая опыты Буллоу, выполненные in vitro, Суонн приходит к заключению, что стимуляцию или торможение притока энергии на конечном этапе интерфазы (в «антефазе») ни в коем случае нельзя рассматривать как общий, а тем более единственный механизм гормональной регуляции клеточного деления.

Прежде всего экспериментальный период составлял в опытах Буллоу лишь несколько часов после изоляции эпидермиса. Далее, подсчет митозов производился в быстро размножающихся клетках мальпигиева слоя. Можно думать, что большинство этих клеток действительно находится в «антефазе» и нуждается лишь в притоке энергии для деления. Однако метод Буллоу не может дать представления о характере влияния гормонов на деление высокодифференцированных клеток, не находящихся в «антефазе». Для ответа на этот вопрос нужны длительные

наблюдения, поскольку вполне логично допустить, что гормоны могут действовать в любой точке жизненного цикла клетки.

На основании проведенного анализа Суонн выдвигает гипотезу о двух возможных путях гормональной регуляции митотического деления. Один путь, менее типичный, связан, как предполагает и Буллоу, со стимуляцией (или торможением) образования энергии на заключительном этапе интерфазы, когда основные синтетические процессы, обеспечивающие подготовку клеток к делению, уже завершены. Другой путь, вероятно, более общий, связан с переключением (switch) всего типа обмена дифференцированных клеток на синтез биополимеров, необходимых для построения митотического аппарата. При этом действие гормонов на клеточное деление осуществляется скорее всего индуктивным путем (в эмбриологическом смысле этого слова). Это означает, что гормоны не являются факторами роста, постоянное присутствие которых нужно для поддержания ключевой ферментативной реакции. Суонн предполагает, что они действуют на более фундаментальном уровне, обеспечивая создание нового типа ферментативного (белкового) синтеза, который в свою очередь обусловливает всю дальнейшую обменную активность клетки. Он допускает, что при этом может происходить переключение энергии с одного русла на другое (см. гл. III, раздел 2).

Большой заслугой Суонна является прежде всего попытка рассмотреть с новых позиций многие хорошо известные факты, что позволило ему внести упорядоченность в существующие представления и сделать их доступными дальнейшему изучению. Плодотворность концепции Суонна заключается в том, что она предполагает существование качественных различий в действии гормонов на различные типы тканей, и в этом ее биологический смысл.

Нам представляется, однако, более правильным оценивать различия в характере действия гормона на клеточное деление, имея в виду специфические и неспецифические по отношению к нему ткани, а не просто ткани с высокой и низкой митотической активностью. Характерно, что в своих последних обзорах Буллоу (W. S. Bullough, 1962a, b) также различает избирательную регуляцию гормонами деления клеток в тканях, специфически реагирующих на гормон, и их неспецифическое и менее выраженное влияние на общий уровень митотической активности в организме. При этом конкретные пути воздействия гормонов на клеточное деление остаются в обоих случаях, как подчеркивает Буллоу (1962a), совершенно неясными. Нам кажется, что вряд ли следует рассматривать эти пути альтернативно, поскольку имеющийся фактический материал не дает оснований исключить возможность гормональной регуляции деления клеток одновре-

менно по двум и даже нескольким каналам. К сожалению, интересные предположения Суонна до сих пор не были подвергнуты экспериментальному исследованию.

3. ВОПРОС О СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕАКЦИИ НА ГОРМОН. ОРГАНЫ-МИШЕНИ, ТКАНИ-МИШЕНИ

Под специфичностью следует понимать сумму реакций живой системы и составляющих ее частей (организма, органа, ткани, клетки, клеточных органелл, макромолекул и т. д.) на определенное воздействие, присущую только данной системе и отличающую ее от других систем. Наличие специфичности и, следовательно, неоднозначности ответа позволяет осуществлять в пределах организма физиологический контроль над функциями органов и клеток.

Естественно, что признаки специфичности являются различными для системы в целом и для ее частей. Для органа и ткани можно вполне определенно ответить на вопрос об их специфичности по отношению к тому или иному гормону: она заключается в их способности реагировать на действие гормона изменением роста или метаболической активности (или обоих признаков одновременно). Таким образом, проблема специфичности реакции ткани на гормон по самому своему существу неразрывно связана с проблемой роста и размножения клеток. Органы и ткани, в которых названные изменения бывают выражены в сильной степени — dramatically, по выражению Вилли (Villee, 1962), получили название органов-мишеней и тканей-мишеней. На этом уровне определение специфичности реакции на гормон может являться достаточно точным.

Однако при переходе от ткани к клетке, то есть от вопроса о специфичности целой популяции клеток к вопросу о специфичности каждой отдельной клетки, возникают трудности в определении внешних признаков этой специфичности. Если клетки представляют собой однородную популяцию, то есть не могут быть отдифференцированы друг от друга морфологически, то специфичность реакции отдельных клеток на гормон может быть констатирована далеко не во всех случаях. Предположим, имеется ткань-мишень специфически реагирующая на действие гормона приростом массы за счет гипертрофии клеток и их усиленного размножения. Морфологически такая реакция будет проявляться в суммарном увеличении среднего объема клеток (ядер) и в повышении среднего митотического индекса ткани. Однако поскольку в контрольной ткани всегда имеется определенный процент крупных и делящихся клеток (ядер), установить с уверенностью, что именно данная конкретная клетка увеличилась в размерах или делится под влиянием гормонального стимула, практически не представляется возможным. В равной мере это

относится к различным проявлениям функциональной активности каждой отдельной клетки, находящейся в пределах клеточной популяции.

Клетки проходят свой жизненный цикл асинхронно, и в каждый момент времени в ткани имеются клетки в самых различных фазах этого цикла, определить которые визуально нельзя. Вызываемые гормоном изменения могут проявляться в одной клетке позже, чем в другой, и вследствие этого не будут зарегистрированы. С другой стороны, часть клеток популяции и в обычных условиях подвержена тем изменениям, которые в остальной массе клеток вызывает гормон. Поэтому закономерности, которые можно установить в пределах клеточной популяции, всегда являются статистическими. Морфологически однородная популяция клеток может оказаться гетерогенной по своей реакции на гормон, и определенный процент клеток в ее составе будет специфически реагировать на его действие. В этом смысле можно считать, что существуют и клетки-мишени.

Все только что приведенные рассуждения справедливы, как уже говорилось, для популяции клеток и не могут быть распространены на отдельно взятую клетку, существующую самостоятельно и не имеющую контактов с другими клетками. Специфичность реакции такой одиночной клетки на гормон может быть, вероятно, охарактеризована достаточно определенно и с помощью морфологических критериев. Однако следует сразу же сказать, что эта норма реакции может не иметь ничего общего со специфичностью ответа клеток, находящихся в составе популяции. Так, было показано (L. Weiss, 1961), что отдельные клетки простаты в культуре не реагируют на добавление в среду тестостерона, в отличие от фрагментов железы. По-видимому, прав Левин (Levine, 1957), считающий, что для полного представления о специфичности реакции ткани на гормон всегда требуется определенная степень сохранности ее структуры.

Все вышеизложенное заставляет признать необходимым выбор более точных показателей для оценки этой специфичности. Вилли (Villee, 1960, 1962, и др.) полагает, что в настоящее время еще нельзя предложить строгого определения отличия ткани-мишени от прочих тканей на молекулярном уровне. Однако поскольку каждый тип ткани характеризуется определенным набором ферментов, возникшим и закрепившимся генетически в процессе эмбриональной дифференциации, Вилли предполагает, что основным свойством, отличающим ткань, специфически реагирующую на определенный гормон, является наличие в ней ферментативной системы, которая может быть избирательно стимулирована или подавлена этим гормоном.

Естественно, что такое определение нельзя считать исчерпывающим (подробно см. гл. VI), и понятие специфичности реакции ткани-мишени на гормон нуждается в дальнейшей экспериментальной расшифровке.

Глава V

РОЛЬ ЭСТРОГЕНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

1. ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ЭСТРОГЕНОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ

Изучение роли эстрогенов в регуляции деления клеток привлекает исследователей с разных точек зрения.

Прежде всего хорошо известно, что эстрогены периодически вызывают специфические перестройки в органах воспроизводящей системы самок, что делает удобным параллельное изучение морфологических изменений этих органов и их митотического режима. Наряду с этим эстрогены оказывают влияние на деление клеток и в некоторых других органах.

Интерес к изучению роли эстрогенов в регуляции деления клеток особенно возрос после того, как было экспериментально показано (Lacassagne, 1932, 1934, 1936, 1937, 1957; Harde, 1934, и др.), что при введении больших доз эстрогенов в организме могут возникать очаги усиленной пролиферации, нередко приобретающие бластоматозный характер (см. Burrows a. Horning, 1952; Gardner, 1953, 1958a, b; Mühlbock, 1956, 1960, 1963; Desaive et al, 1958; Bielschowsky, 1961; Furth a. Kim, 1961; Furth a. Yokoro, 1962; Лазарев, 1961, 1963; Нейман, 1961, 1963; Васильев, 1963; Журавлева, 1964, и др.).

С другой стороны, известно, что эстрогены, как и многие другие вещества стероидной природы, оказывают тормозящее действие на рост опухолей предстательной и молочной желез и некоторых других новообразований (Dirscherl u. Breuer, 1953; Hertz, 1957; Huggins et al., 1958; Merker et al., 1959; Woolley et al., 1960; Шевченко и Кореневский, 1961; Schmid, 1961; Landau et al., 1962; Mühlbock, 1962, и др.). Хотя и доказано, что эстрогены действуют в этих случаях чаще всего опосредовано, изменяя секрецию маммотропных или гонадотропных гормонов гипофиза (Fergusson, 1956; Lyons et al., 1958; Kim a. Furth, 1963; Kim, Furth a. Yannopoulos, 1963; см. также Лазарев и Лагова, 1963; Лазарев, 1963; и др.), имеются данные и об их прямом тормозящем влиянии на деление клеток злокачественных опухолей (Franks, 1959; см. также Лазарев, 1961, и др.).

Может быть именно поэтому выяснению роли эстрогенов в регуляции деления клеток посвящено наибольшее количество исследований по сравнению с другими гормонами, хотя до сих пор и не выработана единая точка зрения на характер их действия. Вопрос в значительной мере осложняется тем, что, как уже было сказано, эстрогены могут в различных условиях оказывать неодинаковое влияние на пролиферативные процессы. В связи с этим исследования велись в разных направлениях: изучались эстрогенная стимуляция митозов и, наоборот, антимитотическое действие эстрогенов. Нам кажется, что роль этих гормонов правильнее всего оценивать, исходя из общих принципов гормональной регуляции деления клеток и учитывая специфичность действия эстрогенов на определенные ткани.

Вопрос о границах стимулирующего действия эстрогенов на деление клеток. Первым обширным исследованием в этой области была работа Буллоу (W. S. Bullough, 1946). Подвергнув изучению митотическую активность самых различных органов самок мышей на разных стадиях эстрального цикла и при введении эстрона, Буллоу пришел к выводу о стимулирующем влиянии последнего на деление клеток в подавляющем большинстве тканей. Он выступает с концепцией об эстрогенах как «всеобщих митотических стимуляторах», преодолевающих «силу клеточной инерции», но подверженных в свою очередь действию «митотического депрессора» неизвестной природы. Крайняя гипотетичность схемы и ее недостаточное фактическое обоснование послужили причиной того, что представления Буллоу не получили никакого развития; между тем в них содержится интересная мысль об адаптационном характере гормональной регуляции митозов.

Критической оценке подверглось и основное положение Буллоу об универсальности стимулирующего действия эстрогенов на деление клеток, поскольку экспериментальные данные, послужившие его основой, не нашли подтверждения в работах других авторов. Картер (Carter, 1953) не обнаружила стимуляции клеточного деления в эпидермисе уха, эпителии пищевода, двенадцатиперстной кишки и мочеточника крыс после введения им эстрона. К такому же заключению пришел и Эблинг (Ebling, 1955), изучавший действие эстрадиола на митозы в эпидермисе и сальных железах самок крыс.

Постепенно Буллоу пересматривает свою первоначальную концепцию и формулирует ее значительно осторожнее, допуская, что действие эстрогенов неодинаково по отношению к митотическому режиму разных тканей. Все же он продолжает рассматривать активацию эстрогенами размножения клеток в половых органах самки как гипертрофированное проявление их общего стимулирующего действия (W. S. Bullough, 1951, 1955b).

Против этого положения Буллоу выступил Алов (1957а, б), который, в соответствии с данными Картер, не получил эстроген-

ной стимуляции митозов в ряде органов (эпителий роговицы, языка и кишечника) у мышей. В то же время после двух инъекций эстрона наблюдалось значительное увеличение количества делящихся клеток в эпителии матки. Сопоставляя эти результаты с известными фактами циклических изменений клеточной пролиферации в тканях матки, влагалища и молочной железы, Алов приходит к выводу о том, что эстрогены стимулируют деление клеток лишь в половых и непосредственно связанных с ними органах, где, следовательно, существует самостоятельная регуляция митозов. На митотическую активность других органов эстрогены существенного влияния не оказывают.

Аллен (J. M. Allen, 1955, 1956, 1957, 1958) провел специальное исследование латентного периода действия половых гормонов (бензоата эстрадиола и пропионата тестостерона) на деление клеток в тканях различного типа. Им было показано, в частности, что при действии эстрогена на эпидермис уха мыши латентный период составляет 6 час., а митотическая активность возрастает приблизительно в два раза. Совсем другая картина наблюдалась в опытах Аллена при исследовании действия эстрадиола на семенной пузырек: в этом случае латентный период составлял 18—24 часа, а митотический индекс увеличивался в 200—300 раз. Отмечая различную чувствительность изученных тканей к эстрогену, связанную с особенностями их метаболизма, Аллен в то же время делает заключение (в соответствии с представлениями Буллоу), что эстрогены в обоих случаях действуют как энергетические стимуляторы деления.

Таким образом, и Алов, и Аллен близко подошли к решению вопроса, но от их внимания ускользнуло то, что увидел Суонн (Swann, 1958), а именно, различная степень положительного ответа тканей на эстрогенную стимуляцию. Пересмотрев и проанализировав под определенным углом зрения большое количество, казалось бы, противоречивой литературы, Суонн сумел обнаружить в ряде тщательно выполненных экспериментальных работ известное логическое несоответствие между наблюдаемыми фактами (например, длительный латентный период действия гормона) и их трактовкой (энергетический стимул по Буллоу). Это позволило ему, как мы видели (см. гл. IV), сформулировать представление о двух возможных путях гормональной регуляции деления клеток в организме, главный из которых реализуется по принципу индуктивного действия гормонов на клетки.

Применительно к эстрогенам это означает, что последние являются in vivo активными стимуляторами клеточного деления (типа индукторов) в органах воспроизводящей системы самок (матка, влагалище, молочная железа и др.), самцов (семенной пузырек, простата и др.), а также в органах, функционально связанных с воспроизводящей системой (гипофиз и некоторые другие

железы внутренней секреции), то есть в органах-мишенях (см. гл. IV). Наряду с этим эстрогены могут оказывать неспецифическое и менее выраженное стимулирующее влияние на деление клеток в других органах путем повышения общего уровня метаболизма (возможно, действуя как энергетические стимуляторы).

2. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В ОРГАНАХ-МИШЕНЯХ

В 1937 г. Аллен и сотрудники (E. Allen, Smith a. Gardner, 1937) показали, что хорошо известный комплекс изменений, вызываемых эстрогенами в матке (увеличение веса и обводнение органа, усиление его гиперемии, утолщение мышечной стенки, разрыхление соединительнотканной стромы, развитие железистой сети и т. д.) и во влагалище (утолщение эпителия, ороговение и слущивание в просвет клеток его верхних слоев), сопровождается количественным увеличением числа делящихся клеток в этих органах. Были прослежены некоторые закономерности наблюдаемых изменений. Оказалось, что при однократном введении кастрированным мышам 5γ эстрогена митотическая активность в эпителии влагалища начинает возрастать через 10—13 час. после инъекции, достигает максимума через 37 час. и снижается к 48 час. Вскоре было показано (Crandall, 1938), что повышение митотического индекса, наблюдающееся в соединительнотканных и мышечных клетках кольцевой мускулатуры матки кролика в ранние сроки беременности, можно вызвать введением в различных сочетаниях эстрогенов и прогестерона. Вслед за тем Тисловиц (Tislowitz, 1939) получил эстрогенную стимуляцию митозов в мышечной, соединительной и эпителиальной тканях простаты и семенного пузырька у мышей.

Это были первые работы, в которых производился количественный учет числа митозов при экзогенном введении эстрогенов; они были выполнены на сравнительно небольшом материале без применения методов статистической обработки. Однако результаты этих работ были в дальнейшем неоднократно воспроизведены в различных модификациях опытов.

В многочисленных исследованиях, выполненных на разнообразном материале, преимущественно на грызунах, было достоверно установлено, что кастрация снижает, а повышение содержания эстрогенов в организме, наоборот, увеличивает митотический индекс в клетках фолликулярного аппарата яичников (Lane a. Davis, 1939; Lane, 1940; W. S. Bullough, 1942, 1943; Bradbury, 1961), в эпителии и других отделах матки (W. S. Bullough, 1946; Williams, 1948; Gelfant, Meyer a. Ris, 1955; Алов, 1957а, б; Tice, 1961; Лагучев, 1962; Лагучев и Каргина-Терентьева, 1963, и др.), в эпителии влагалища (Biggers a. Claringbold, 1955a, b; Claring-

bold, 1955; Claringbold a. Biggers, 1955; Martin a. Claringbold, 1958; Martin, Cox a. Emmens, 1961; Darcis, 1962; Лагучев, 1962; Лагучев и Каргина-Терентьева, 1963), в эпителии молочных желез (Альтман, 1945; W. S. Bullough, 1946; Лагучев, 1958, 1959а, б, 1960, 1962; Лагучев и Будик, 1960; Лагучев и Каргина-Терентьева, 1963, и др.), в эпителии сосков (Bujard, Brun et Jadasson, 1958), в передней доле гипофиза (Ladman, 1954; Miętkiewski, 1959, и др.), в половых железах самцов (Burkhart, 1942; Dirscherl et al., 1948; J. M. Allen, 1955, 1956; Piroth u. Khalil, 1961, и др.).

Латентный период, доза. В процессе выполнения этих исследований выявились некоторые особенности действия эстрогенов на деление клеток в специфических по отношению к ним тканях. Прежде всего оказалось, что в действии этих гормонов на митоз имеется довольно продолжительный латентный период, о предполагаемом значении которого уже говорилось. Было обнаружено, далее, что для поддержания высокого уровня митотической активности в ткани не обязательно постоянное присутствие гормона. Однократное введение эстрогена вызывает повышение митотического индекса, сохраняющееся, в зависимости от характера ткани, от двух до нескольких дней. В то же время известно, что вводимые извне стероиды подвергаются в организме быстрому распаду — иногда в пределах одного часа (Gallagher, 1954; Dorfman, 1955, 1962; Antoniades et al., 1960; Engel a. Cameron, 1960, и др.).

Отсюда, естественно, возник вопрос о зависимости митотического индекса от дозы эстрогена. В одной из работ (Dirscherl et al., 1948) было детально изучено действие различных доз андрогенов (от 10 до 2000γ) и эстрогенов (от 1 до 2000γ) на деление клеток в эпителии семенных желез мыши при двукратном введении гормонов с интервалом в 15 час. и последующим забоем животных через 24 часа; за 9 час. до забоя вводили колхицин. Линейная зависимость между стимулирующим действием гормона на митотический индекс и логарифмом дозы была найдена только для тестостерона, в то время как у других андрогенов она отсутствовала. Природные (эстрадиол, эстрон) и синтетические (диэтилстильбэстрол) эстрогены также стимулировали клеточное деление в эпителии желез, но в меньшей степени, чем андрогены. Максимальный эффект наблюдался в пределах широкой шкалы доз (от 10 до 1000γ). Следует, однако, отметить, что в описываемой работе были исследованы главным образом большие дозы эстрогенов, что не позволяло считать вопрос окончательно решенным.

Интересно, что в опытах Алова (1957а, б) эстрон оказывал тормозящее действие на митозы в эпителии семенных пузырьков и простаты у мышей. К сожалению, в работе отсутствуют точные указания на дозы и сроки исследования, что исключает возможность сопоставления этих данных с результатами других авторов.

Между тем Аллен (J. M. Allen, 1955, 1956, и др.), работы которого упоминались нами раньше, наблюдал увеличение митотической активности в эпителии семенных пузырьков уже через 18 час. после однократной инъекции мышам 16γ эстрадиола с максимумом делений через 54 часа и менее выраженное повышение митотического индекса в эпителии простаты через 72 часа после введения гормона; стимулирующий эффект эстрадиола сохранялся дольше, чем при введении мышам той же дозы андрогенного стимулятора — тестостерона. На митозы в эпидермисе уха оба гормона оказывали стимулирующее действие, но латентный период действия эстрадиола был значительно короче (6 час.) по сравнению с тестостероном (18 час.). О стимулирующем действии эстрадиола на митотическую активность эпителия семенных пузырьков крыс еще раньше сообщала Буркхарт (Burkhart, 1942); максимум делений в ее опытах наблюдался, как и у Аллена, через 55 час. после однократного введения гормона.

Зависимость митотического индекса от дозы эстрогена изучал также Тайс (Tice, 1961), выбравший в качестве объекта эпителий матки мыши. Используя более физиологические дозы гормона (от 0,00025 до 250γ эстрадиола при однократном введении и забое животных через 24 часа после воздействия гормоном и через 4 часа после введения колхицина) и увеличивая их каждый раз на порядок, Тайс наблюдал близкую к линейной зависимость между эффектом (увеличение митотического индекса) и дозой лишь на небольшом отрезке кривой (в пределах 0,00025—0,025γ). Затем следовал крутой подъем, и митотический индекс достигал максимума при дозах 0,25—1γ. Большие дозы эстрадиола также оказывали стимулирующее действие на митотическую активность эпителия матки, однако в меньшей степени, чем дозы 0,25—1γ, и кривая постепенно начинала опускаться, сохраняясь, однако, на достаточно высоком уровне по сравнению с контролем, и при самой большой дозе — 250γ. Таким образом, следует признать, что прямая зависимость между дозой вводимых эстрогенов и увеличением митотической активности ткани, по-видимому, существует лишь в ограниченных пределах и может быть выявлена только при использовании небольших доз гормона. Стоун (G. M. Stone, 1962) подтвердил данные Тайса, показав, что дозы 1 и 10γ эстрадиола действуют одинаковым образом на матку мышей. Суонн считает это одним из доказательств индуктивного характера действия эстрогенов на митоз.

Из сказанного не вытекает, разумеется, что в данном случае перестает действовать «закон двухфазного ответа» («закон доз»), согласно которому малые дозы вещества стимулируют, а большие угнетают течение процесса. Известно, что существуют токсические дозы эстрогенов, подавляющие клеточное деление in vitro (см. McKerns et al., 1958; McKerns, 1963a, b, c; Troop a. Possanza, 1962). В то же время при использовании физиологических

концентраций гормона in vivo и наличии оптимальных для стимуляции деления доз постоянная линейная зависимость эффект — доза отсутствует. Интересно, что даже очень большие дозы эстрогенов не оказывают тормозящего действия на деление клеток in vivo (Pettersson, 1962). Причиной этого является, по-видимому, быстрый метаболизм эстрогенов и то, что продукты их обмена оказываются менее «эстрогенными» по биологическому действию (Paschkis a. Rakoff, 1950, и др.). Кроме того, следует учитывать, что не все клетки в пределах одной и той же ткани обладают одинаковой чувствительностью к эстрогенам. Сопоставив ряд экспериментальных данных из области эндокринологии и эмбриологии, Суонн (Swann, 1958) пришел к заключению, что разброс чувствительности отдельных клеток к эстрогенам в органах-мишенях очень близок к распределению чувствительности клеток к индуктивному стимулу в эмбриогенезе.

Лагучев на основании собственных наблюдений по изменению митотического индекса (Лагучев, 1962; Лагучев и Каргина-Терентьева, 1963) располагает эпителии органов воспроизводящей системы по чувствительности их клеток к эстрогенам в следующем порядке: матка (эпителий желез) — матка (эпителий полости) — влагалище — молочные железы.

Гипертрофия клеток. Увеличение размеров клеток при действии эстрогенов на специфические по отношению к ним органы было описано очень давно и является одним из основных критериев активности гормона. Однако количественные исследования в этом направлении немногочисленны, а параллельному изучению гипертрофии и митотической активности клеток при действии эстрогенов посвящены лишь единичные работы.

При исследовании яичников беременных крыс Бассет (Bassett, 1949) обнаружил, что прирост числа митозов не покрывает увеличения объема желтых тел. Проведя кариометрические, цитофотометрические и гисторадиографические измерения, Гелфант и Клеммонс (Gelfant a. Clemmons, 1955) показали, что введение крысам в возрасте одного месяца 0,1 γ 17β-эстрадиола (три инъекции с интервалами в 24 часа) вызывает двукратное увеличение объема ядер в эпителии маточных желез и трехкратное — в эпителии, выстилающем полость матки. Содержание ДНК на ядро оставалось при этом постоянным. Авторы предположили, что ответственной за гипертрофию ядер является белковая фракция негистонного характера, содержание которой удваивается при удвоении объема ядра и утраивается при его увеличении в три раза.

В следующей работе (Gelfant, Meyer, a. Ris, 1955) некоторым животным параллельно с 17β-эстрадиолом (те же условия воздействия, что и в предыдущей работе) вводили вещества, являющиеся ингибиторами митотического деления — аминоптерин и азотистый аналог иприта. Оба соединения полностью подавляли

увеличение веса матки, вызываемое эстрадиолом, и значительно снижали митотический индекс во всех отделах органа (эпителий желез и полости, соединительнотканная строма, мышцы); толщина миометрия и стромы оставалась почти без изменений, и матка в целом выглядела, как у кастрированных животных. Однако высота эпителия, выстилающего полость матки, возрастала под влиянием эстрадиола, невзирая на то, что деление клеток было подавлено ингибитором. Точно так же увеличивались размеры ядер и ядрышек.

Таким образом, было показано, что гипертрофия клеток эпителия матки под влиянием эстрогенов может происходить независимо от вызываемой ими гиперплазии, то есть митотического деления, и что, следовательно, эти два процесса регулируются с помощью различных механизмов.

Аминоптерин является антагонистом фолиевой кислоты — метаболита, выполняющего важную функцию в синтезе предшественников ДНК, и можно было думать, что его тормозящее действие на митоз связано с прекращением или замедлением синтеза ДНК. Это было подтверждено в опытах с введением животным одновременно эстрадиола, аминоптерина и фактора цитроворум — биологически активной формы фолиевой кислоты; в этих условиях понижения митотического индекса не происходило.

Поскольку аминоптерин не препятствовал, как было сказано выше, проявлению действия эстрадиола на гипертрофию клеток, Гелфант, Мейер и Рис пришли к выводу о том, что последняя регулируется механизмами, отличными от механизмов регуляции не только деления клеток, но и синтеза ДНК. Тем самым они частично подтвердили данные предыдущей работы (Gelfant a. Clemmons, 1955), не возвращаясь, однако, к вопросу о значении белковой фракции, связанной с вызываемой эстрогенами гипертрофией клеток. Этот вопрос вновь начал исследовать несколько лет спустя Мюллер (Mueller et al., 1958), высказавший на основании своих данных новые плодотворные идеи о первичных механизмах действия эстрогенов на клеточный метаболизм (см. раздел 3 гл. VI).

Из приведенных работ следует, что эстрогены влияют на рост матки как путем гиперплазии, так и путем гипертрофии клеток, не связанной непосредственно с их размножением и, возможно, регулируемой другими механизмами. К тому же заключению приходят Броди и сотрудники (Brody, 1958; Brody, a. Westman, 1960; Brody a. Wiqvist, 1961), показавшие, что в матке крыс, стимулированной эстрадиолом, фаза гипертрофии предшествует не только размножению клеток, но и синтезу ДНК; в фазе гипертрофии происходит нарастание активности ДНК-азы, опережающее по времени синтез ДНК и РНК. В настоящее время известно (Sarkar et al., 1963), что для начала синтеза нуклеи-

новых кислот в клетке необходима определенная концентрация ДНК-азы, обеспечивающая функционирование отдельных участков ДНК-матрицы.

Интересно, что, в отличие от данных по изменению митотического индекса при действии разных доз эстрона на матку мыши, Тайс (Tice, 1961) наблюдал строго линейное увеличение объема профазных ядер с увеличением дозы гормона (от 0,1 до 250 γ). Неодинаковый характер зависимости гиперплазии и гипертрофии клеток от действия эстрогена также свидетельствует о различии механизмов, регулирующих эти процессы.

Действие повторных инъекций эстрогена. Буллоу (W. S. Bullough, 1946) показал, что при повторном введении мышам 25 γ эстрона с интервалами в 12 час. максимальное увеличение митотического индекса в эпителии матки наблюдается после одной и двух инъекций гормона, а затем число клеточных делений падает почти до нуля, сохраняясь на низком уровне и в дальнейшем (всего было сделано 6 инъекций). Гелфант, Мейер и Рис (Gelfant, Meyer a. Ris, 1955) отмечают, что митотический индекс в эпителии матки крыс был выше после двух инъекций 0,1 γ 17β-эстрадиола, чем после трех инъекций. В опытах Лагучева (1959б) митотическая активность эпителия молочных желез у мышей повышалась при ежедневном введении 2,5 γ эстрона в течение восьми дней, но значительно уменьшалась после десяти инъекций гормона. Сходная картина наблюдалась при исследовании в этом плане и действия других гормонов (Sawyer a. Everett, 1959; Browning et al., 1961, и др.).

Условия проведения опытов не позволяют считать причиной угнетения митотической активности при повторном введении эстрогенов (как и других гормонов) чрезмерное повышение концентрации их в организме. Во всех приведенных работах использовались физиологические дозы гормонов, суммарная концентрация которых в конце эксперимента не превышала дозу, вызывающую при однократном введении стимуляцию клеточного деления в том же органе (например, в опытах Гелфанта и др.). По-видимому, в данном случае начинают действовать механизмы авторегуляции, приводящие к стабилизации процесса (см. гл. I, раздел 2). По данным Браунинга и др. (Browning et al., 1961), существует гомеостатический механизм, регулирующий вес органов кастрированного животного при увеличении дозы вводимого тестостерона.

При повторном введении гормона вступает в силу «правило исходного состояния», согласно которому различные факторы стимулируют какую-либо функцию при пониженной ее напряженности и тормозят — при повышенной. Так, например, 17β-эстрадиол, тестостерон и кортизон увеличивают активность гексокиназы в клетках асцитного рака Эрлиха при исходной низкой активности фермента и подавляют ее при исходной высокой

активности (Dirscherl u. Projan, 1962). Таким образом, можно думать, что торможение деления клеток при повторном введении эстрогенов представляет собой одно из проявлений действия механизмов, обеспечивающих процессы авторегуляции в живом организме.

3. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В ОРГАНАХ, НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К КАТЕГОРИИ ОРГАНОВ-МИШЕНЕЙ

Как уже говорилось в начале настоящего раздела, эстрогены могут оказывать стимулирующее влияние на деление клеток и в некоторых органах, не имеющих отношения к воспроизводящей системе. Лучше всего в этом плане исследован эпидермис мыши.

Первые данные о стимулирующем действии эстрогенов на митотическую активность эпидермиса кожи спины у мышей были получены в работах Буллоу и сотрудников (W. S. Bullough, 1946; 1950a, b; H. F. Bullough, 1947; W. S. Bullough a. van Oordt, 1950, и др.), показавших, что подкожное введение животным 25 γ эстрона вызывает увеличение числа митозов в эпидермисе в 2,5 раза, а повторное введение через 12 час. той же дозы гормона повышает митотический индекс в 5 раз. Однако продолжающиеся инъекции эстрона (6 и более) приводят к угнетению митотической активности в эпидермисе и падению ее ниже исходного уровня, подобно тому, как это происходит в эпителии матки и молочных желез, то есть в органах-мишенях. По-видимому, именно это обстоятельство и послужило главным образом причиной противоречивых данных о действии эстрогенов на деление клеток в эпидермисе и некоторых других органах.

Так, Хукер и Пфейфер (Hooker a. Pfeiffer, 1943), сообщившие о тормозящем действии эстрадиол-бензоата на рост эпидермиса кожи спины и сальных желез у мышей, производили инъекции гормона дважды в неделю в течение длительного времени. При продолжительном введении мышам эстрона Буллоу (H. F. Bullough, 1947) наблюдала снижение митотического индекса не только в эпидермисе, но и в эпителии волосяных фолликулов. Исследовав действие 25 γ эстрона на деление клеток в эпидермисе и в эпителии пищевода, двенадцатиперстной кишки и мочеточника молодых крыс, Картер (Carter, 1953) пришла к заключению, что ее данные не подтверждают представлений Буллоу о стимулирующем действии эстрогенов на митотическую активность в организме. Однако в опытах Картер животным производили до забоя пять последовательных инъекций эстрона с интервалом в 12 час., иначе говоря, введение гормона во всех опытах было длительным и, следовательно, эффект стимуляции мог остаться незамеченным. Вывод о том, что митозы в эпидермисе и сальных железах не подвержены действию эстрогенов, был сделан также Эблингом (Ebling, 1955), который исследо-

вал преимущественно длительное действие повторных инъекций эстрона (17—29 дней). В тех же опытах Эблинга, где эстрон вводили в течение двух дней, в обоих органах число митозов увеличилось в полтора раза. Как уже сообщалось, Аллен (J. M. Allen, 1955, 1956, и др.) получил четкий эффект эстрогенной стимуляции деления клеток в эпидермисе уха мыши.

Алов (1957б) наблюдал торможение митозов в эпителии языка и роговицы у мышей при шестикратном введении 2,5 и 10 γ эстрона, в то время как двукратное введение 2,5, 10 и 30 γ эстрона не оказывало действия на митотическую активность этих органов. На деление клеток в эпителии крипт двенадцатиперстной кишки эстрон вообще не оказывал влияния.

Возможно, что в опытах Алова, как и в работе Картер, подъем числа митозов в исследованных органах происходил раньше выбранных сроков фиксации материала и поэтому не мог быть обнаружен в условиях проводимых экспериментов. В литературе имеются данные о стимулирующем действии эстрогенов на деление клеток в эпителии кишечника и лимфоузлов морской свинки (Brauchhardt, 1953).

Резюмируя все сказанное, можно сделать заключение, что эстрогены способны стимулировать митотическую активность как в эпидермисе, так и в других органах, не относящихся к категории органов-мишеней. Для решения вопроса о характере действия эстрогенов на деление клеток того или иного органа в каждом случае необходимы исследования с применением дробных сроков фиксации материала при одновременном и повторном введении гормона. До настоящего времени нет доказательств первичного тормозящего действия физиологических доз эстрогенов на митотическую активность in vivo. Вопрос об отсутствии влияния эстрогенов на деление клеток в ряде органов в силу указанных причин также остается открытым. Повторное введение эстрогенов приводит к угнетению митотической активности и в органах, не относящихся к категории органов-мишеней. Следовательно, это свойство эстрогенов можно считать общей особенностью их воздействия на митотический режим организма.

4. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ ОРГАНОВ

При инкубации органов-мишеней в целом виде или отдельными кусочками специфичность их реакции на гормон в течение некоторого времени сохраняется.

В опытах Мёнье (Meunier, 1959) добавление эстрадиола в среду с культивируемыми в течение двух недель кусочками эндометрия кролика, извлеченными из животного, находившегося в состоянии ложной беременности, вызывало развитие желез и

изменение морфологии эпителиальных клеток; эстрадиол в сочетании с прогестероном стимулировал клеточное размножение. Эверетт (J. Everett, 1962, 1963), инкубируя в течение 6 дней матку морской свинки по разработанному ею методу, наблюдала увеличение числа митозов в эпителии и соединительнотканной строме органа при добавлении в среду эстрогенов в концентрации 1 $\gamma/мл$. При этом эстрон вызывал наибольший стимулирующий эффект, за ним следовал эстрадиол и далее эстриол.

Биггерс и др. (Biggers et al., 1956) описали типичную картину морфогенетических изменений влагалища мыши при добавлении в среду для инкубации $3{,}9\times10^{-6}$—$7{,}8\times10^{-6}$ $\gamma/мл$ эстрона. Инкубируя в присутствии эстрадиола (5×10^{-4} M) молочную железу мыши в течение 10—14 дней, Лафарг (Lasfargues, 1960) обнаружил характерную гормональную стимуляцию эпителия. Сопоставление реакции нормальной и раковой ткани молочной железы мыши на эстрон (0,2 $\gamma/мл$) в условиях 5-дневной инкубации выявило следующую зависимость между степенью малигнизации ткани и ее ответом на стимулирующее действие гормона: лучше всего реагировала на гормон ткань нормальной железы, в меньшей степени — ткань в состоянии предрака, еще меньше — неопластическая ткань (Elias a. Rivera, 1959).

Применение больших концентраций стероидных гормонов оказывает токсический эффект на клетки инкубируемых органов (Perlman et al., 1962). При инкубации в присутствии 6,6 $\gamma/мл$ эстрадиола кусочков опухолей грудной железы, взятых у пациентов, которым предварительно вводили гормоны, в 21% случаев наблюдалось подавление роста опухолей и включения в белки C^{14}-лейцина. Тестостерон оказывал подобное действие в 68% случаев. Ни в одном из эксплантатов не было отмечено стимуляции роста (Heuson a. Legros, 1963).

Приведенные работы позволяют считать, что инкубация органов-мишеней является одним из возможных способов количественного изучения действия эстрогенов на процессы пролиферации. Принимая во внимание большой латентный период, предшествующий подъему числа митозов при эстрогенной стимуляции органов-мишеней, желательно проводить исследования в условиях относительно длительной инкубации органа. Особое внимание следует обращать на концентрацию эстрогенов в среде, поскольку разрыв между физиологическими и токсическими дозами гормонов в условиях инкубации органов, по-видимому, сокращается.

Начало изучения действия эстрогенов на деление клеток при инкубации органов, не являющихся органами-мишенями, относится к более раннему периоду и связано с разработкой в лаборатории Буллоу метода инкубации кусочков уха мыши (W. S. Bullough a. M. Johnson, 1951b), о котором шла речь в предыдущей главе.

В опытах Буллоу инкубация органа продолжалась всего 5 час. Буллоу исходил из предположения о том, что все митозы, возникшие в мальпигиевом слое эпидермиса перед взятием материала, должны завершиться в течение первого часа инкубации. Поэтому через 1 час после начала опыта Буллоу добавлял в среду колхицин, останавливающий митозы в метафазе, после чего инкубация продолжалась еще 4 часа, которые и составляли собственно экспериментальный период. По условиям опыта, воздействиям в этот период могут подвергаться только вновь возникающие митозы.

С помощью разработанного метода Буллоу (W. S. Bullough, 1953, и др.) обнаружил, что эстрогены способны стимулировать митотическую активность в эпидермисе только в присутствии глюкозы, которая, как он предполагал, является основным источником энергии для деления клеток (см. предыдущую главу). Поскольку такой же уровень митотической активности достигался и в отсутствие эстрогенов, но при добавлении в среду фруктозы, лактата или пирувата, Буллоу пришел к заключению, что эстрогены стимулируют митозы в эпидермисе путем активации вяло протекающей глюкокиназной реакции, что в конечном счете приводит к усилению притока энергии в «антефазе» (W. S. Bullough, 1955b, и др.).

Представления Буллоу подверглись критике со стороны Гелфанта (Gelfant, 1959a, b, 1960a, b, c, d, и др.), обнаружившего в опытах с инкубацией эпидермиса уха мыши, что прямая зависимость между кислородным напряжением среды и числом возникающих митозов имеет место при добавлении к среде глюкозы только в концентрации 0,02 *M*, которой пользовался и Буллоу. Однако эта концентрация не является, по данным Гелфанта, оптимальной для протекания митозов в условиях инкубации, поскольку наиболее высокий митотический индекс в эпидермисе наблюдается при добавлении глюкозы в концентрации 0,002 *M*. На основании этого Гелфант подвергает сомнению всю теорию утилизации глюкозы как энергетического источника, так как эта теория базируется, по его мнению, на данных, полученных в субоптимальных условиях опыта. Добавление в среду гормонов (эстрона, эстрадиола, прогестерона, тестостерона и АКТГ) не оказывало в опытах Гелфанта заметного действия на деление клеток в эпидермисе; в то же время добавление следов (10^{-7} *M*) солей металлов, присутствующих в виде примесей в продажных препаратах гормонов, способно было само по себе стимулировать или угнетать протекание митозов. Такой же эффект оказывали некоторые не используемые в тканях млекопитающих сахара: галактоза, арабиноза, рибоза и ксилоза.

В итоге своих экспериментальных исследований Гелфант подвергает сомнению всю концепцию «антефазы», полагая, что теоретические представления Буллоу не выдержали эксперимен-

тальной проверки. Он предлагает отказаться от традиционного, по его выражению (1960d), взгляда на глюкозу как на энергетический метаболит и склонен приписать ее стимулирующее влияние на митотическую активность эпидермиса участию в переносе специфических катионов или же действию на осмотические свойства клеток. Исходя из этого, Гелфант приходит к заключению, что в основе стимуляции или торможения митозов при добавлении гормонов в инкубационную среду лежат иные механизмы, чем те, по которым осуществляется регуляция деления клеток в организме.

Буллоу и Лоуренс (W. S. Bullough a. Laurence, 1961a) выступили с резкой отповедью критике Гелфанта, найдя в его опытах ряд методических ошибок. Не вдаваясь в детали этой полемики, которая в различной форме продолжалась и в последующие годы (см. W. S. Bullough, 1962a; Gelfant, 1963a), следует вместе с тем отметить, что основное содержание критических статей Гелфанта составила лишь негативная сторона вопроса, без каких-либо соображений об усовершенствовании метода инкубации или о границах его применения для изучения гормональной регуляции митоза.

Между тем метод Буллоу послужил основой для разработки техники кратковременного инкубирования других органов: яичников (Weaver, 1959), глаз (Уткин, 1961; Уткин и др., 1961, 1962) и других, на модели которых многие данные Буллоу нашли подтверждение; его метод был признан перспективным и полезным «для расшифровки факторов, контролирующих ход митоза, и для выяснения условий, определяющих его возникновение в клетке» (Уткин и др., 1961). К сожалению, в этих исследованиях не подвергалось изучению действие на митоз гормонов, и поэтому вопрос о том, в какой мере можно моделировать механизмы гормональной регуляции деления клеток в организме в условиях кратковременной инкубации органа, остается открытым.

5. ВОПРОС ОБ АНТИМИТОТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ

Поиски в этом направлении были стимулированы успешным применением эстрогенов для лечения некоторых дисгормональных опухолей. Возник вопрос о том, носит ли подавление роста опухолей при введении в организм эстрогенов вторичный характер (нарушение функции гипофиза, «гормональная кастрация» и т. д.) или же возможно прямое тормозящее действие эстрогенов на митоз.

В связи с этим были предприняты многочисленные исследования действия природных и синтетических эстрогенов на дробящихся яйцах иглокожих и червей, на зародышах рыб и амфибий, а также в культуре тканей. Было показано, что добавление в среду эстрогенов в концентрации 7×10^{-6}—7×10^{-5} M (что

соответствует 2—20 γ/*мл*) подавляет митотическое деление у развивающихся яиц морского ежа (Ludwig u. v. Ries, 1938; Druckrey, 1938; Druckrey et al., 1952; Agrell, 1954, 1955a, b, 1957, 1961; Agrell a. Persson, 1956; Jolley et al., 1962, и др.), кольчатого червя Tubifex (Lüscher u. Huber, 1945; Lehmann, 1947), тритона (Töndury, 1944; Cagianut, 1949; Schenk, 1950, и др.), аксолотля (Töndury, 1947) и рыбы Brachydanio rerio (Huffman et al., 1957; Jones et al., 1960, и др.), в зародышевом диске куриного эмбриона (Rickenbacher, 1956), в культуре фиброцитов кролика (von Möllendorff, 1939a, b, 1943; Töndury a. Cagianut, 1951; Cagianut, 1958, 1960 и др.; Cagianut et al., 1959), фибробластов мыши (von Haam a. Cappel, 1940; Kuchler et al., 1962, 1963, и др.), цыпленка (Lettré, 1943a, 1961c, и др.) и человека (Ozzello, 1964), клеток HeLa и KB (Bimes, Planel et al., 1959, 1961, 1962; Planel et al., 1961, 1962).

Этими исследователями описаны характерные изменения, происходящие в клетках под влиянием эстрогенов: образование вакуолей в ранней метафазе, остановка движений хромосом, появление хромосомных аберраций, возникновение многополюсных митозов, синцитиев и т. д. Действие малых концентраций эстрогенов, как правило, обратимо. Так, например, дробление яиц морских ежей, остановленное эстрогенами, возобновляется при перенесении яиц в свежую морскую воду (Agrell, 1954, и др.). Большие концентрации эстрогенов вызывают пикноз и гибель клеток.

Токсический эффект, оказываемый эстрогенами, привел к тому, что их стали называть «митотическими ядами» (von Möllendorf, 1939a, b и др.; Lettré, 1943b; Lehmann 1947; Friedmann et al., 1948; Druckrey et al., 1952, и др.), предположив, что они действуют на клетки как колхициноподобные, или статмокинетические вещества, нарушая структуру веретена и звезд (Lüscher u. Huber, 1945; Agrell, 1954, и др.).

Дальнейшее изучение показало (Agrell, 1955a), что под влиянием эстрогенов в клетках развивающихся яиц морского ежа Psammechinus miliaris уменьшается количество ДНК; добавление к среде метаболитов ДНК снижает ингибирующий эффект. При этом действие эстрогена направлено в первую очередь на резерв цитоплазматической ДНК, которая расходуется по мере развития эмбриона. Когда последний начинает синтезировать ДНК самостоятельно, чувствительность его к эстрогенам падает. Энергетический обмен эмбриона под влиянием эстрогенов, по-видимому, не нарушается; вискозиметрические измерения не выявили изменений со стороны комплекса актомиозин — АТФ, а очищенная АТФ не снимала действия эстрогенов на дробление.

В следующей работе (Agrell a. Persson, 1956) была предпринята попытка проанализировать характер влияния эстрогенов (эстрадиола) на ДНК. Учитывая скорость диализа продуктов

расщепления ДНК и ДНП (дезоксирибонуклеопротеидов), выделенных из спермы морского ежа, авторы пришли к заключению, что эстрадиол разрывает связь между ДНК и белком гистонного типа, облегчая, таким образом, действие ДНК-азы на ДНК, присутствующую в цитоплазме в форме ДНП. Следствием расщепления эстрадиолом ДНП является уменьшение вязкости цитоплазмы, повышение содержания SH-групп и как следствие — распад звезд и веретена. Поскольку продукты расщепления ДНК в присутствии ДНК-азы и эстрадиола становятся иными, чем при действии одной ДНК-азы, можно думать, что эстрадиол вызывает нарушение синтеза ядерной ДНК, а это в свою очередь приводит к появлению хромосомных аберраций.

Опыты Агрелла в известной мере проливали свет на механизм действия большой группы так называемых гепариноподобных веществ из яичников различных видов животных (морские звезды, ракообразные, рыбы, амфибии, птицы, млекопитающие), антимитотический эффект которых был открыт и изучен главным образом Гейльбруном и его школой (Dunn, 1953; Heilbrunn et al., 1953, 1954, 1955, 1956, 1957; Tosteson et al., 1958, 1959, и др.). В опытах Гейльбруна и сотрудников было показано, что экстракты из яичников угнетают дробление яиц кольчатого червя у Chaetopterus pergamentaceus, препятствуя повышению вязкости цитоплазмы во время митоза (эффект трансформации золя в гель), являющемуся, по Гейльбруну (Heilbrunn, 1956, и др.), необходимым условием деления клетки (см. гл. I, раздел 1). Введение таких экстрактов мышам тормозило рост привитой опухоли Эрлиха (Heilbrunn et al., 1955, 1957, и др.), что послужило стимулом для дальнейшего изучения их действия. Однако неоднозначность результатов привела к тому, что это направление исследований было постепенно оставлено. Кроме того, появилось много фактов, свидетельствовавших о том, что тормозящее действие эстрогенов на опухоли in vivo в большинстве случаев не является прямым.

Исследования Агрелла по антимитотическому действию эстрогенов на дробление яиц иглокожих в течение ряда лет не пополнялись новыми данными. В основных сводках, посвященных влиянию гормонов на митоз (W. S. Bullough, 1955b, 1962a; Swann, 1958), им отведено всего по нескольку строк. Суонн считает затруднительной интерпретацию колхициноподобного действия эстрогенов на яйца иглокожих и допускает, что они могут оказывать простой наркотический эффект. И Буллоу, и Суонн высказывают предположение о том, что противоположные результаты, получаемые при действии эстрогенов in vivo и in vitro, обусловлены различием применяемых концентраций: малые дозы гормона in vivo стимулируют митотическое деление, большие in vitro тормозят его. Такой же точки зрения придерживается Басс (Bass, 1959).

Однако материал, полученный различными исследователями в опытах in vitro, не позволяет (как и в случае опытов in vivo) поставить наблюдаемый эффект в прямую зависимость от концентрации эстрогенов. Так, например, по данным Бима и др. (Bimes et al., 1959, 1961, 1962), эстрадиол подавляет рост клеток HeLa и KB в концентрациях от 0,2 до 50 $\gamma/мл$; в то же время в опытах Буллоу с инкубацией эпидермиса уха мыши добавление в среду эстрадиола в концентрации 5 и 10 $\gamma/мл$ стимулировало митотическую активность. Подобное же влияние оказывают in vitro и другие стероиды (Agrell, 1954; Snell a. Bass, 1960; D. Stone, 1962; D. Stone a. Kang, 1962; Arpels et al., 1964).

Сравнительно недавно (Jolley et al., 1962) данные Агрелла об угнетающем действии эстрадиола на синтез ДНК в развивающихся яйцах Psammechinus miliaris были подтверждены на другом иглокожем — Strongylocentrotus purpuratus. Проведя опыты с изучением включения в ДНК C^{14}-глицина, авторы пришли к выводу, что необходимая для дробления энергия направляется под влиянием эстрогена на другие синтетические процессы, в частности, на образование свободных аминокислот.

Интересные результаты были получены в опытах Кюхлера и сотрудников (Kuchler et al., 1962, 1963), показавших, что C^{14}-эстрон и C^{14}-эстрадиол в концентрации 10^{-7}—10^{-5} M полностью подавляют синтез ДНК и белка в культуре L-клеток, а при концентрации $3{,}5\times10^{-5}$ M (10 $\gamma/мл$) прекращается рост культуры. При этом наблюдалась быстрая абсорбция гормонов на поверхности клеток. Добавление к среде лошадиной сыворотки снижало абсорбционные свойства эстрогенов, и для угнетения клеточного деления нужны были бо́льшие дозы. Расчеты показали, что для полного подавления митоза требуется около 10^9 молекул эстрадиола на клетку. Авторы полагают, что в условиях проведенных опытов проникновения эстрогенов в клетки практически не происходило и что они подавляли митотическое деление, блокируя транспорт субстратов.

Заключая изложение материала по влиянию эстрогенов на деление клеток, можно предположить, что в основе их действия in vivo, а также в условиях продолжительной инкубации органов in vitro лежат иные механизмы, чем при действии на культуры клеток. Антимитотический эффект эстрогенов, наблюдаемый во время дробления яиц и роста культур, представляет собой проявление прямого угнетающего влияния гормонов на клетки и не имеет ничего общего с феноменом тормозящего действия повторных инъекций эстрогенов на митотическую активность in vivo, обусловленным процессами авторегуляции. Для оценки значения различных путей воздействия эстрогенов на деление клеток необходимо разобрать вопрос о механизмах регуляции ими отдельных звеньев клеточного метаболизма.

Глава VI.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭСТРОГЕНОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Основной вопрос, который встает перед исследователями в этой области, заключается в следующем: каким образом эстрогены изменяют весь тип метаболизма органов-мишеней в такой степени, что это приводит к их росту?

В настоящее время существует несколько предположений о возможном механизме действия эстрогенов на клетку:

1) эстрогены изменяют проницаемость клеточных оболочек;

2) эстрогены взаимодействуют с ферментативными системами;

3) эстрогены контролируют активность генов.

1. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТКИ

Действие эстрогенов на поверхность целой клетки. Нарушение проницаемости оболочки интактной клетки, по-видимому, нельзя рассматривать как основной и тем более единственный способ действия гормона, так как в этом случае все исследования in vitro, в которых бывает нарушена целость клеток, никогда не воспроизводили бы основных эффектов, получаемых in vivo. Однако известны случаи такого способа действия гормонов. Проявлением его можно считать влияние гормонов на пиноцитоз — один из механизмов транспорта метаболитов через клеточную мембрану. Вейсс (L. Weiss, 1961) полагает, что таким образом могут действовать и стероидные гормоны, но при этом он подчеркивает, что вопрос о конкретном механизме их влияния на пиноцитоз в различных тканях пока не может быть даже поставлен на обсуждение. В этом направлении нужно накапливать фактический материал. К тому же пиноцитоз отнюдь не является универсальным механизмом проникновения веществ в клетки (см. Зеленин, 1962; Лагучев и др., 1962; Wittekind, 1963).

Действие эстрогенов на мембраны цитоплазматических органелл. Изменение проницаемости оболочек отдельных внутриклеточных структур, например митохондрий, является, как считает

Энгель (Engel, 1961), вполне возможным способом действия на клетку стероидов (в том числе эстрогенов), которые известны как поверхностно активные соединения с сильной степенью сродства по отношению к внутриклеточным барьерам. Уилмер (Willmer, 1961) связывает канцерогенное действие эстрогенов и прочих стероидов исключительно с их влиянием на свойства внутриклеточных мембран. Особое значение Уилмер придает концевым группам стероидных гормонов, присоединенным к C_3 и C_{14}; по мнению Уилмера, эти группы облегчают проникновение молекул гормона в фосфолипидный монослой мембран (см. также Dirscherl u. Schriefers, 1961). Прямых доказательств в пользу этих предположений пока не получено.

Предположения о механизмах действия эстрогенов на проницаемость клеток. Если даже признать в качестве основного способа регуляции эстрогенами метаболизма клеток изменение проницаемости, то это не решает вопроса о механизмах подобной регуляции. Остается неизвестным, взаимодействует ли при этом гормон с какой-либо системой, ответственной за поддержание барьера, влияя таким путем на поверхность клетки, или же он вызывает изменения физических свойств мембран, что пока звучит довольно неопределенно (Engel, 1961). Мюллер и др. (Mueller et al., 1958) полагают, что во втором случае затрудняется миграция энергии через барьер в плане представлений Сент-Дьердьи (Szent-Györgyi, 1957), однако какие бы то ни было данные по этому поводу отсутствуют. Существует мнение о том, что эстрогены повышают проницаемость клеток матки, вызывая локальное освобождение гистамина (Spaziani, Szego, 1958, 1959; Spaziani, 1963a, b; см. также обзор Кальсона — Kahlson, 1962), однако эта точка зрения встречает возражения других авторов (Mueller, 1960), считающих, что в описываемых опытах гистамин оказывал токсическое действие на клетки. В заключение этого раздела следует сказать, что поскольку клеточная проницаемость является важным фактором клеточной активности в целом, недооценивать возможность действия гормонов на это свойство клетки нельзя (см. Hechter, 1957, 1960; Hechter a. Lester, 1960). По мнению Карльсона (Karlson, 1963a), таким образом можно полностью объяснить способность инсулина регулировать транспорт сахаров, а также многие стороны действия тироксина на митохондрии. Однако попытки выявить сходный механизм действия для эстрогенов дали отрицательный результат (Halkerston и др., 1960). Кроме того, феномены проницаемости все еще ждут физической и биохимической интерпретации, и молекулярная природа их до сих пор неясна. По-видимому, изменение проницаемости можно рассматривать лишь как один из аспектов гормональной регуляции метаболизма, не считая этот процесс основным механизмом действия гормонов на клетку (см. Hechter, 1961).

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ С ФЕРМЕНТАТИВНЫМИ СИСТЕМАМИ

Общие принципы взаимодействия гормонов с ферментами. Вопросу о ферментативных реакциях, обусловливающих характер действия эстрогенов, посвящено, пожалий, наибольшее количество исследований из области биохимии стероидных гормонов. Попытки установить природу специфичности действия эстрогенов на органы-мишени направлены на решение главным образом этого вопроса. Не случайно поэтому он является предметом постоянных дискуссий на крупных симпозиумах и конференциях последних лет.

Кроме уже упоминавшейся конференции в Массачусетсе, можно назвать Лондонский симпозиум по изучению роли клеточных механизмов в выработке и действии гормонов (1960), традиционные ежегодные конференции в Канаде, посвященные гормонам (1960—1963), и др.

Основная особенность, создающая трудности в изучении вопроса о взаимодействии эстрогенов с ферментами, заключается в способности этих гормонов вызывать в органах-мишенях такой обширный круг биохимических изменений, который не позволяет сразу идентифицировать первичную реакцию. И все же, если представить себе, что каждый тип ткани характеризуется определенным набором ферментов, вполне оправданными становятся попытки найти ту критическую ключевую реакцию и катализирующий ее фермент, которые являются особо чувствительными к действию эстрогенов.

На выяснение этого вопроса вот уже в течение восьми лет направлены усилия двух крупных биохимических лабораторий, руководимых Вилли и Талалаем, в Гарвардском и Чикагском университетах (США).

В большей части ферментативных систем обнаружены следующие компоненты (рис. 14): 1) собственно фермент (белок); 2) кофермент, кофакторы и активаторы; 3) субстраты и продукты. Гормон может действовать на ферментативную систему, изменяя количество или активность фермента (белка) или же изменяя его восприимчивость к одному из кофакторов или субстратов. Исходя из этого, Вилли (Villee, 1962) называет несколько возможных механизмов взаимодействия гормонов с ферментами.

А. Гормон может изменять скорость образования новых молекул фермента из его более простых предшественников, способствуя увеличению числа активных молекул фермента на единицу массы ткани, а тем самым и повышению общей ферментативной активности системы. В подтверждение возможности такого механизма Вилли приводит данные Нокса и Ауэрбаха (Knox a. Auerbach, 1955) показавших, что количество трипто-

фанпирролазы в печени крыс может быть увеличено с помощью инъекции кортизона. В более позднее время получены доказательства того, что это происходит за счет увеличения содержания ферментного белка (Feigelson a. Greengard, 1962). Данные о действии эстрогенов в этом плане отсутствуют.

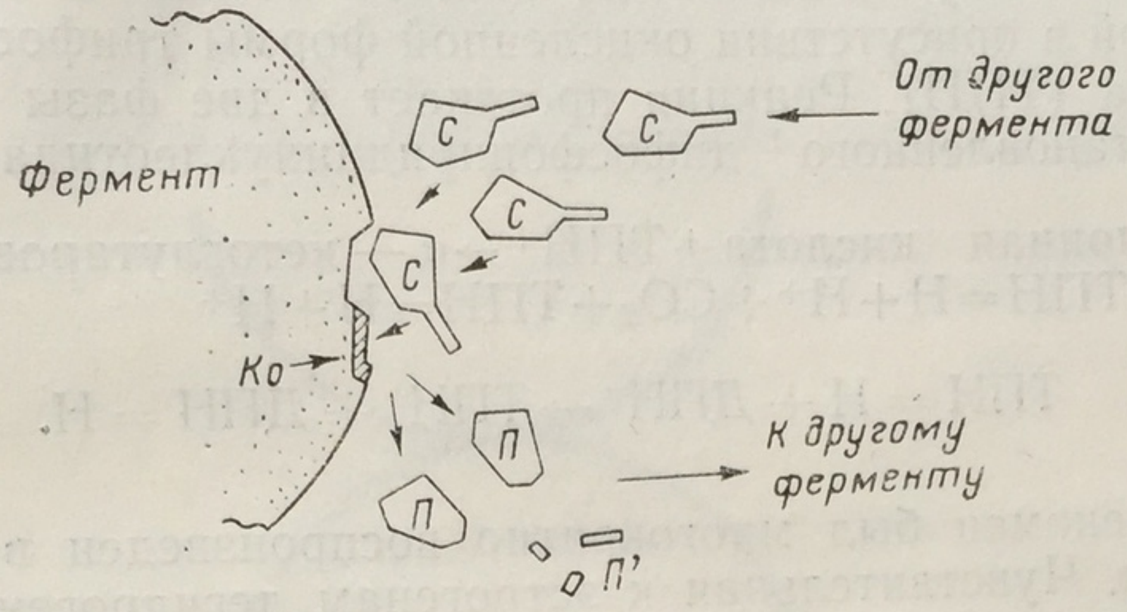


Рис. 14. Гипотетическая поверхность фермента (Mueller et al., 1958)

Ко — кофермент; *С* — активированные молекулы субстрата; *П* и *П'* — молекулы продуктов

Б. Гормон может изменять активность уже существующей молекулы белка, превращая фермент из неактивной формы в активную. Это положение является теоретической основой представлений Вилли и его школы о механизме действия эстрогенов на клетку.

В. Гормон может непосредственно вовлекаться в качестве кофермента или кофактора в реакцию, катализируемую ферментом. Другими словами, физиологическое действие гормона направлено на такие реакции, участвуя в которых, он и сам подвергается изменениям. В этой концепции, развиваемой главным образом школой Талалая (Talalay, 1957, и др.), проявление физиологического действия эстрогенов и их метаболизм рассматриваются как две стороны одного и того же процесса.

Г. Гормон может конкурировать с одним из кофакторов за определенное место в молекуле фермента и тем самым подавлять общую активность ферментативной системы. Имеются данные о том, что подобным образом может в некоторых случаях действовать тироксин (Wolfe a. Ball, 1957), эстрогены же в этом плане исследованы не были.

Не исключено, что один и тот же гормон в определенных условиях может осуществлять свое действие несколькими путями (Villee, 1962; Jensen, 1962, и др.).

В настоящее время по вопросу о механизме реакций эстрогенов с ферментами развиваются главным образом взгляды Вил-

ли и Талалая, защищаемые представителями каждого из этих двух направлений. Каков же экспериментальный материал, лежащий в основе предлагаемых концепций?

Представления школы Вилли. Еще в 1955 году Вилли (Villee, 1955) обнаружил, что эстрадиол и другие эстрогены стимулируют дегидрогеназу изолимонной кислоты плаценты человека, инкубируемой в присутствии окисленной формы трифосфопиридиннуклеотида (ТПН). Реакция протекает в две фазы с образованием восстановленного[1] дифосфопиридиннуклеотида (ДПН-Н):

$$\text{Изолимонная кислота} + \text{ТПН}^+ \rightarrow \alpha\text{—кетоглутаровая кислота} + CO_2 + \text{ТПН} = \text{Н} + \text{Н}^+ + CO_2 + \text{ТПН} = \text{Н} + \text{Н}^+ \quad (1)$$

$$\text{ТПН} = \text{Н} + \text{ДПН}^+ \rightarrow \text{ТПН}^+ + \text{ДПН} = \text{Н}. \quad (2)$$

Этот феномен был многократно воспроизведен в лаборатории Вилли. Чувствительная к эстрогенам дегидрогеназа изолимонной кислоты была найдена в ряде органов-мишеней: эндометрии, молочной железе и гипофизе и не была обнаружена в печени, сердце, легких, почках и головном мозгу человека (Gordon a. Villee, 1955; Villee a. Gordon, 1955; Hagerman a. Villee, 1957; Villee a. Hagerman, 1957). Однако в дальнейшем оказалось, что чувствительной к эстрогенам системой является не дегидрогеназа изолимонной кислоты, а трансгидрогеназа пиридиннуклеотидов, катализирующая реакцию переноса водорода от ТПН-Н к ДПН (Villee a. Hagerman, 1958; Villee, 1959 a, b). Первоначально же описанная чувствительная к эстрогенам дегидрогеназа изолимонной кислоты оказалась ферментным комплексом, состоящим из обычной дегидрогеназы изолимонной кислоты, реагирующей с ТПН, и чувствительной к эстрогенам трансгидрогеназы.

Анализ результатов работ по изучению действия эстрогенов на отдельные реакции внутриклеточного метаболизма привел Вилли к заключению, что они стимулируют в органах-мишенях самые различные ферментативные системы (Giering a. Zarrow, 1958; Leonard, 1958; Rosa a. Velardo, 1959 a, b, и др.). Трудно представить себе, что гормон активирует каждый фермент в отдельности. Гораздо логичнее предположить, что эстрогены стимулируют одну ключевую реакцию, в результате которой образуется соединение, участвующее (требуемое) во всех фермента-

---

[1] В последнее время проведено упорядочение биохимической номенклатуры (см. «Классификация и номенклатура ферментов». М., ИЛ, 1962) и для пиридиннуклеотидов предложены новые наименования. Так, например, дифосфопиридиннуклеотид (ДПН) обозначается как никотинамид-аденин-динуклеотид (НАД) и т. д. Однако многие авторы, в том числе Вилли и Талалай, придерживаются пока прежних наименований, которые будут сохранены в тексте для удобства изложения.

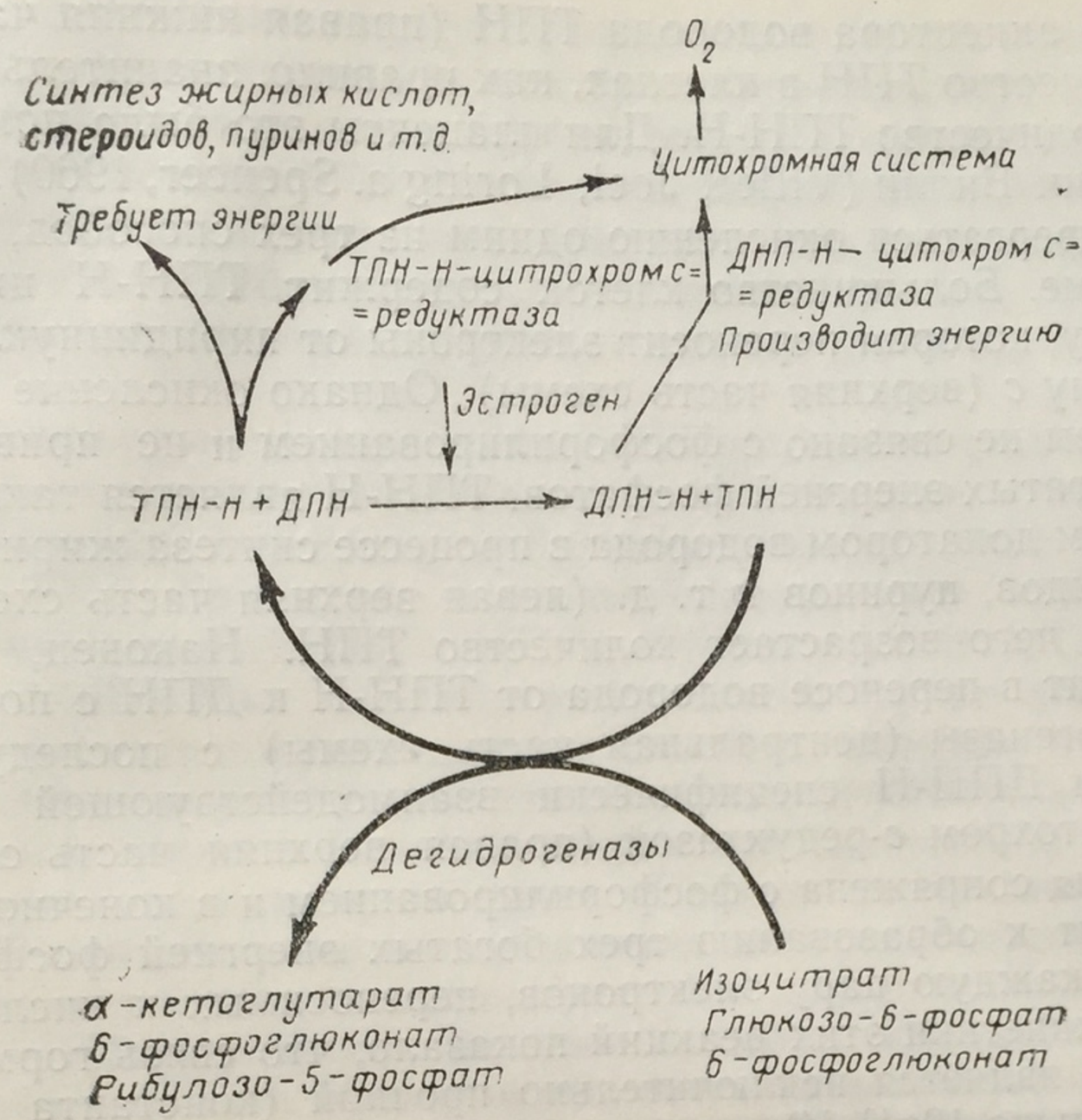


Рис. 15. Схема, иллюстрирующая ключевую роль трансгидрогеназной реакции в образовании энергии (Villee, 1962)

тивных реакциях. Так Вилли приходит к своей основной гипотезе, что первичным действием эстрогенов на клетку является активация ими трансгидрогеназной реакции, в которой йоны водорода переносятся от восстановленного ТПН-Н к ДПН. Результатом повышения активности трансгидрогеназы является освобождение в единицу времени больших количеств энергии (в форме макроэргических фосфатов или тиоэфиров), которая может быть использована в биологических системах. Это в свою очередь приводит к повышению синтеза белков, жиров, нуклеиновых кислот и других соединений. Вилли считает, что образование необходимой для биологических реакций энергии является звеном, лимитирующим синтетические реакции в отсутствие эстрогенов (Villee, Hagerman a. Joel, 1960; Villee, 1960, 1962; Hagerman a. Villee, 1961). Он предлагает следующую схему, иллюстрирующую перечисленные процессы (рис. 15).

В клетках имеется два вида пиридиннуклеотидов — ДПН и ТПН, и каждая дегидрогеназа специфична только по отношению к одному из них. Дегидрогеназы изолимонной кислоты (изоцитрата), глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата требуют

в качестве акцептора водорода ТПН (правая нижняя часть схемы). Количество ТПН в клетках, как правило, значительно меньше, чем количество ТПН-Н. Для плаценты это было показано в лаборатории Вилли (Villee, Joel, Loring a. Spencer, 1960). ТПН-Н может подвергаться окислению одним из трех способов, указанных в схеме. Большинство клеток содержит ТПН-Н цитохром *c*-редуктазу, которая переносит электроны от пиридиннуклеотида к цитохрому *c* (верхняя часть схемы). Однако окисление ТПН-Н таким путем не связано с фосфорилированием и не приводит к синтезу богатых энергией фосфатов. ТПН-Н является также специфическим донатором водорода в процессе синтеза жирных кислот, стероидов, пуринов и т. д. (левая верхняя часть схемы), в результате чего возрастает количество ТПН. Наконец, третий путь состоит в переносе водорода от ТПН-Н к ДПН с помощью трансгидрогеназы (центральная часть схемы) с последующим окислением ДПН-Н специфически взаимодействующей с ним ДПН-Н-цитохром *c*-редуктазой (правая верхняя часть схемы). Эта реакция сопряжена с фосфорилированием и в конечном итоге приводит к образованию трех богатых энергией фосфатных связей на каждую пару электронов, переносимых к кислороду. Изучение кинетики этих реакций показало, что связь гормона с ферментом является исключительно прочной (константа диссоциации меньше 10^{-10} *M*).

Таким образом, повышение концентрации эстрогенов, воздействующих на зависимую от них трансгидрогеназу, увеличивает количество ТПН, окисляемого с большим выходом макроэргических фосфатов.

Существенным, по мнению Вилли, является тот факт, что плацента человека содержит две трансгидрогеназы: одну в митохондриях и другую в растворимой фракции цитоплазмы, причем чувствительна к эстрогенам лишь вторая. Последнее обстоятельство вызывает известное недоумение, так как со времени работ Ленинджера и сотрудников (Lehninger, et al., 1958) известно, что дыхательные ферменты растворимой части клеток (клеточного сока) в процессе функционирования в дыхательной цепи не продуцируют макроэргов, то есть окисление субстрата идет в данном случае по нефосфорилирующему пути (подробно см. Скулачев, 1962).

Поэтому влияние эстрогена на трансгидрогеназу растворимой части клеток по существу не может приводить к накоплению богатых энергией соединений, что не согласуется с основными представлениями Вилли.

Трансгидрогеназная реакция не является легко обратимой. Попытки обратить ее с помощью лактикодегидрогеназы (системы, генерирующей ДПН-Н) оказались безуспешными (Villee a. Hagerman, 1958). Создается впечатление, что ТПН становится ингибитором трансгидрогеназы. Однако, подобрав определенные

условия, сотрудникам лаборатории Вилли удалось показать, что эстрогены могут направлять ход трансгидрогеназной реакции в сторону активации синтеза жирных кислот и других соединений, идущего с участием ТПН-Н (Hosoya, Hagerman a. Villee, 1960). Это представляет принципиальную важность, поскольку, как будет видно в дальнейшем, эстрогены, действительно, активируют основные синтетические процессы в клетке (Mueller, Herranen a. Jerwell, 1958).

Представления школы Талалая. Параллельно с лабораторией Вилли ферментативные реакции, чувствительные к эстрогенам, стали изучать в лаборатории Талалая (Talalay, 1957; Hurlock a. Talalay, 1958; Talalay a. Williams-Ashman, 1958; Talalay, Hurlock a. Williams-Ashman, 1958a, b; Williams-Ashman, Cassman a. Klavins, 1959). Уже в первых работах этой группы исследователей были подтверждены данные Вилли о наличии в плаценте человека растворимой трансгидрогеназы, чувствительной к 17β-эстрадиолу. Однако Талалай предлагает совершенно иное объяснение наблюдаемому эффекту (Talalay a. Williams-Ashman, 1960). Он считает, что обнаруженная им трансгидрогеназа плаценты может быть идентифицирована с дегидрогеназой оксистероида — 17β-эстрадиола, которая способна реагировать как с ДПН, так и с ТПН. При этом сам эстроген действует как кофактор переноса водорода между пиридиннуклеотидами, подвергаясь в свою очередь окислительно-восстановительным превращениям. Реакция обратима и протекает следующим образом:

$$\text{Эстрадиол} + \text{ДПН}^+ \rightleftarrows \text{эстрон} + \text{ДПН} = \text{H} + \text{H}^+$$
$$\text{Эстрон} + \text{ТПН} = \text{H} + \text{H}^+ \rightleftarrows \text{эстрадиол} + \text{ТПН}^+$$
$$\overline{\text{ТПН} = \text{H} + \text{ДПН}^+ \rightleftarrows \text{ДПН} = \text{H} + \text{ТПН}^+}$$

В своих представлениях Талалай (Talalay, 1961, 1962) исходит из того, что дегидрогеназы оксистероидов являются широко распространенными ферментами, катализирующими обратимые, зависимые от пиридиннуклеотидов реакции окисления специфических стероидных спиртов в кетоны. Большинство этих ферментов одинаково хорошо взаимодействует в тканях млекопитающих как с ди-, так и с трифосфопиридиннуклеотидами. Таким образом, суть гипотезы Талалая состоит в том, что ответственным за физиологическое действие эстрогенов является единственный фермент — эстрадиолдегидрогеназа, которая, в силу своей двоякой избирательности к ди- и трифосфопиридиннуклеотидам, осуществляет перенос водорода в этой системе с одновременным окислением и восстановлением гормона.

Вилли и его сотрудники не раз выступали с энергичным протестом против этой концепции (Villee, Hagerman a. Joel, 1960; Hagerman a. Villee, 1961; Villee, 1962, и др.). Одним из доводов

в их рассуждениях служил тот факт, что эстрадиолдегидрогеназа содержится в самых различных тканях, не являющихся специфическими по отношению к эстрогенам. Действительно, совсем недавно она была найдена в печени крыс (McGuire a. Pesch, 1962; Pesch, Piros a. Klatskin, 1962; Pesch, Piros a. Moquin, 1963). Далее в лаборатории Вилли было показано (Hagerman a. Villee, 1959), что дегидрогеназа и трансгидрогеназа плаценты участвуют в различных реакциях, имеют различную скорость инактивации и могут быть физически изолированы друг от друга с помощью электрофореза на бумаге. В процессе разделения этих ферментов было обнаружено существование двух различных эстрадиолдегидрогеназ, одна из которых специфически взаимодействует с ДПН, а другая — с ТПН. Будучи смешанными, эти дегидрогеназы оказались неспособными осуществлять трансгидрогеназную реакцию, которая является необратимой. По мнению Вилли, Талалай совершенно необоснованно приписывает одному ферменту двойную функцию. Со своей стороны, Талалай (Talalay, 1961, 1962) утверждает, что его сотрудники не смогли получить данных, совпадающих с результатами опытов Вилли. В настоящее время в лаборатории Талалая продолжается упорная работа по очистке и дальнейшему исследованию свойств 17β-оксистероиддегидрогеназы (Adams et al., 1962; Jarabak et al., 1962; Kawahara et al., 1962).

Одно время создалось впечатление, что взгляды Талалая находят подтверждение в работах Энгеля и Скотт (Engel a. Scott, 1960; Scott a. Engel, 1961), показавших способность стероидных гормонов образовывать молекулярные комплексы с пуринсодержащими соединениями. Исследовав подробно строение молекулы ДПН, Энгель и Скотт установили близость расположения в ней аденинового (рис. 16, *2*) и пиридинового (рис. 16, *4*) колец, что, по их мнению, создает большие возможности для комплексообразования и последующего влияния на коферментную активность.

Однако никаких доказательств в пользу этого предположения пока получено не было. Хотя эстрогены и подвергаются в процессе обмена окислению и восстановлению, тот факт, что они не являются непременными компонентами важнейших биологических процессов, которые они стимулируют, косвенно свидетельствует против их коферментной функции. В опытах с эстрадиолом, меченным тритием, было прямо показано, что эстрадиол не превращается в эстрон в матке крыс (Flesher et al., 1960; Jacobson, 1962; Jensen a. Jacobson, 1962).

С другой стороны, в схеме Талалая импонирует наличие механизма, поддерживающего постоянное образование ТПН-Н, являющегося, как уже говорилось, специфическим донатором водорода для осуществления многих биосинтетических процессов. Согласно же схеме Вилли, эстрогенная стимуляция

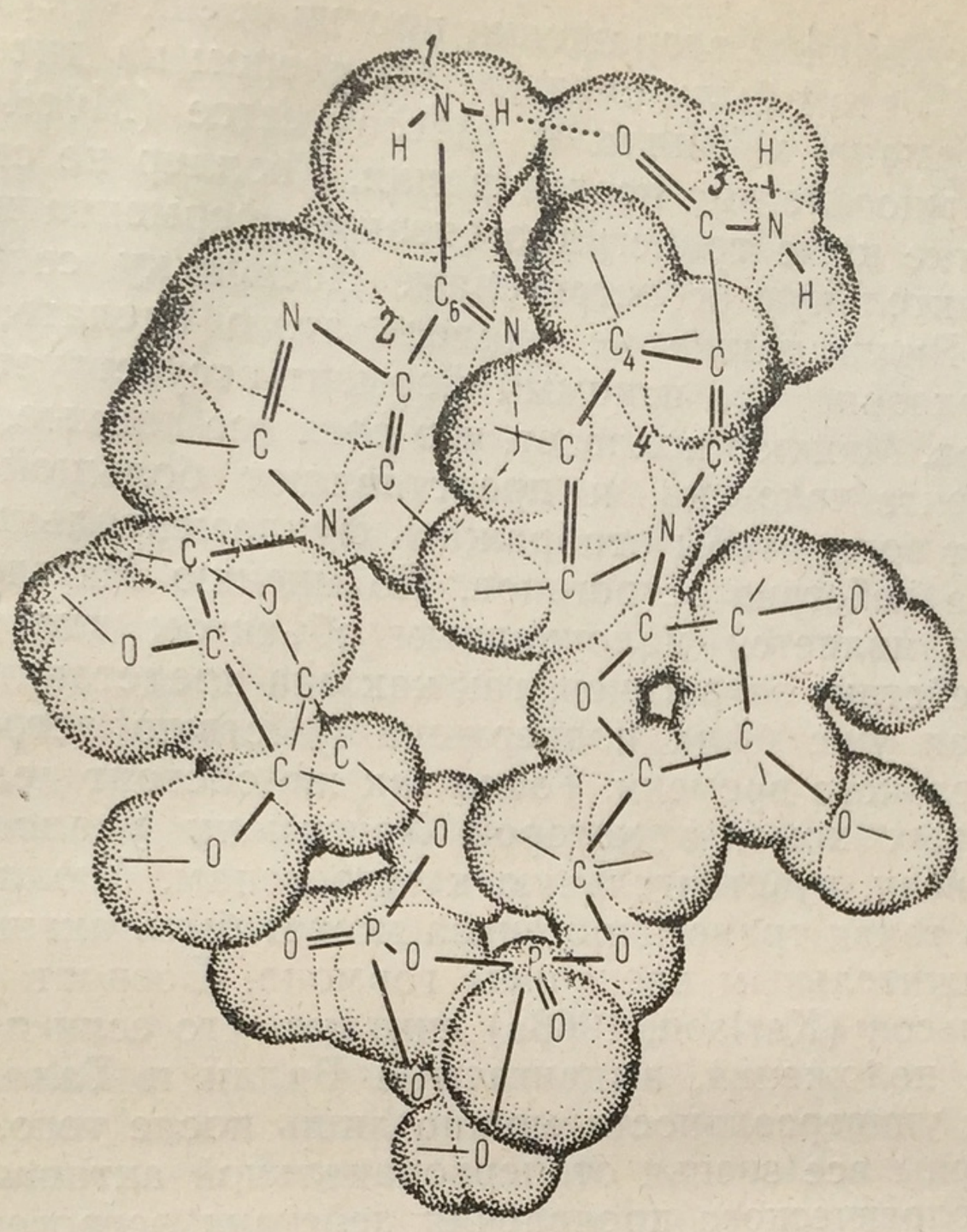


Рис. 16. Модель свернутой (скрученной) формы восстановленного дифосфопиридиннуклеотида, показывающая водородную связь между аминогруппой (*1*) аденина (*2*) и карбонилом амидной группы (*3*) восстановленного остатка пиридина (*4*) (Engel a. Scott, 1960)

вызывает не повышение, а снижение содержания ТПН-Н в клетке, что плохо согласуется с данными об усилении синтеза жирных кислот, белков и пуринов в матке при введении эстрадиола (Mueller et al., 1958).

Критика теорий Вилли и Талалая. Помимо разногласий между Вилли и Талалаем по частным вопросам их теорий, высказывались сомнения и в правильности основных представлений обеих школ.

Неоднократно подвергалась критике концепция Вилли об «эстрогеночувствительной» («эстрогенозависимой», как он теперь ее называет) трансгидрогеназе. Долгое время не удавалось воспроизвести основной эффект с помощью искусственных эстрогенов, но потом было показано (Glass et al., 1961), что чувствительная к эстрогенам трансгидрогеназа может быть активирована и диэтилстильбэстролом, только в концентрации не выше 10^{-7} *М*.

Наиболее серьезные возражения против обеих «ферментативных» теорий в целом были сделаны Мюллером на дискуссии по докладу Хагермана и Вилли в Массачусетсе (Mueller, 1961). Несмотря на многолетние исследования, Мюллер не смог обнаружить в матке крыс трансгидрогеназную ферментативную систему, чувствительную к эстрогенам. Поскольку сотрудникам лаборатории Вилли также не удалось этого сделать, а кроме того, было показано, что искомый фермент отсутствует в матке свиней и коров, Мюллер полагает, что хотя все данные, получаемые на плаценте человека, и представляют большой интерес, они далеки от того, чтобы отображать фундаментальные стороны механизма действия эстрогенов. По мнению Мюллера, плацента вообще является малоудачным объектом для изучения первичного действия эстрогенов, так как она представляет собой ткань, которая уже была подвержена действию эстрогенов в течение длительного времени. Точно так же обстоит дело с маткой беременных крыс, в которой Хагерману удалось найти трансгидрогеназу, чувствительную к эстрогенам. Мюллер предполагает, что такая трансгидрогеназа может быть активирована лишь продолжительным введением гормона. Боскотт (Boscott, 1962) и Карльсон (Karlson, 1963a) считают, что если даже верны основные положения, выдвигаемые Вилли и Талалаем, то судить об их универсальности можно лишь после того, как будут прослежены все звенья от первоначальной активации фермента до биологического проявления действия эстрогена (рост ткани и т. д.). Кроме того, с позиций теорий Вилли и Талалая трудно объяснить многообразие видовых различий в реакции на эстрогены.

3. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

Эта точка зрения стала высказываться сравнительно недавно (Korner, 1960; Allison, 1961; Dorfman, 1961; Karlson, 1963a, и др.) и обязана своим появлением успехам, достигнутым в области изучения механизмов белкового синтеза и его регуляции (см. Crick, 1961, 1963a, b, а также обзоры Дворкина, 1962; Спирина и Смирнова, 1962; Баева, 1963; Георгиева, 1964, и др.). Однако экспериментальной основой этого представления послужило фундаментальное исследование Мюллера и сотрудников (Mueller, Herranen a. Jervell) по механизму действия эстрогенов, выполненное еще в 1958 г. Именно эти данные позволили Мюллеру начать серию необычайно интересных работ, успешно развиваемых им в настоящее время. Прежде чем перейти к изложению фактического материала, надо сделать несколько предварительных замечаний.

Схема генетического контроля белкового синтеза Жакоба — Моно была рассмотрена нами в разделе 2 гл. I. Хотя Моно и Жакоб (Monod a. Jacob, 1961), допускают, что в дифференцированном организме регулирующие системы могут быть значительно более усложненными и даже отличными от систем, которыми располагает микробная клетка, они в то же время считают маловероятным, чтобы механизмы индукции-репрессии совсем не использовались высшими организмами. Они полагают вполне своевременной экспериментальную проверку возможности по крайней мере для некоторых гормонов выступать в качестве индукторов, репрессоров или так называемых аллостерических ингибиторов (то есть таких ингибиторов, угнетающее действие которых не связано со структурным сходством с субстратом в отличие от обычных конкурентных ингибиторов). В настоящее время в этом направлении уже добыты некоторые факты, которые можно кратко суммировать.

Изучение механизмов белкового синтеза с помощью антибиотиков. Первые успехи в изучении этого вопроса связаны с применением в исследованиях ряда антибиотиков, о которых уже упоминалось в гл. II.

Антибиотики пуромицин и актиномицин D обладают свойством избирательно блокировать отдельные этапы биосинтеза макромолекул (см. обзор: Simpson, 1962). При этом пуромицин нарушает синтез белка на стадии трансляции, подавляя способность т-РНК переносить активированные аминокислоты на рибосомы (Yarmolinski a. de la Haba, 1959). Возможно, что пуромицин действует при этом как конкурентный аналог т-РНК (Bosch a. Bloemendal, 1961), вытесняя ее из строящейся полипептидной цепочки на рибосоме (Nathans, 1964). Имеются данные о том, что он обладает более широким диапазоном действия (Holland, 1963; Tamaoki a. Mueller, 1963).

Актиномицин *D* подавляет ДНК-зависимый синтез РНК, взаимодействуя с дезоксигуаниловой кислотой и инактивируя ДНК-матрицу (Goldberg a. Rabinowitz, 1962; Goldberg, Rabinowitz a. Reich, 1962, 1963; Harbers a. Müller, 1962; Hurwitz et al., 1962; Goldberg, Reich a. Rabinowitz, 1963). Различными авторами независимо друг от друга показано, что актиномицин *D* ингибирует синтез всех классов РНК, другими словами, что синтез всей РНК зависит от ДНК (Perry, 1962, 1963; Reich et al., 1962; Tamaoki a. Mueller, 1962; Merits, 1963).

Исследования лаборатории Мюллера. Эстрогены — индукторы белкового синтеза. В уже упоминавшемся исследовании Мюллера и сотрудников (Mueller et al., 1958) и в других работах этой лаборатории (Herranen a. Mueller, 1957; Mueller, 1957; McCorquodale a. Mueller, 1958; Aizawa a. Mueller, 1960, 1961) было детально прослежено стимулирующее действие эстрадиола на многочисленные метаболические процессы в матке крыс.

С помощью меченых соединений было показано усиление синтеза фосфолипидов, нуклеинового и белкового синтеза в инкубируемой ткани матки, взятой у животных, которым предварительно вводили гормон. В ходе дальнейшего исследования выяснилось, что в основе наблюдаемых изменений лежит нарастание активности специфических ферментов, принимающих участие в реакциях биосинтеза. Встал вопрос о том, что же служит причиной изменения самой ферментативной активности: активация уже существующих белков или же синтез ферментов de novo? Несмотря на многочисленные эксперименты, Мюллеру и сотрудникам не удалось обнаружить никакой активации предсуществующих ферментов (в плане представлений Вилли и Талалая), которая бы опережала по времени наблюдаемое увеличение общей ферментативной активности (в частности, исследовали серинальдолазу и другие ферменты, активирующие аминокислоты). Мюллер приходит к заключению, что под влиянием эстрогенной стимуляции в матке крыс происходит синтез белков de novo. Он делает вывод, что вся проблема действия эстрогенов может рассматриваться как проблема регуляции синтеза биополимеров (Mueller, 1960).

В 1961 г. вышла новая работа Мюллера и сотрудников (Mueller, Gorski a. Aizawa, 1961), в которой было показано, что пуромицин в дозе 15 γ на 90% подавляет включение C^{14}-глицина в белки матки кастрированных крыс через 4 часа после инъекции эстрадиола. Такой же эффект наблюдается при введении пуромицина контрольным животным. В то же время синтез пуринов (включение C^{14}-глицина в аденин фракции нуклеиновых кислот матки), фосфолипидов и РНК (включение неорганического фосфата P^{32}) протекал в присутствии пуромицина у контрольных животных почти без изменений. Однако усиление этих процессов, обычно наблюдавшееся при введении эстрогена, полностью снималось действием пуромицина. Более того, даже такие ранние реакции в ответ на введение эстрогена, как увеличение веса матки и обводнение ее тканей, были блокированы пуромицином. Отсюда авторы делают заключение, что первичное действие эстрогена связано с системой, чувствительной к пуромицину, иными словами, с белковым синтезом. Если синтез белка подавлен, ткань не реагирует на эстроген. Докладывая выполненную работу вне программы на конференции в Массачусетсе (1961), Мюллер развивает эту мысль дальше и приходит к предположению, что первичное действие гормона заключается в индукции синтеза специфических белков, ответственных за наблюдаемые изменения.

В свете проведенных экспериментов Мюллер считает маловероятным представление о том, что в основе действия эстрогенов лежит изменение общего энергетического уровня клетки (по Вилли). Он приводит данные о том, что пуромицин не

влияет на систему трансгидрогеназ плаценты. По мнению Мюллера, его опыты свидетельствуют также против возможности прямого нарушения эстрогеном клеточной проницаемости, поскольку было показано, что и этот аспект действия гормонов зависит от синтеза белка.

Мюллер отвечает положительно на вопрос о том, имеет ли он в виду индукцию синтеза, подобную той, которая наблюдается при взаимодействии вируса с бактериальной клеткой. Он полагает, что индукция белкового синтеза лежит в основе всей суммы ранних реакций клетки на эстроген. По-видимому, в ткани контрольных животных (в данном случае в матке кастрированных крыс) механизмы белкового синтеза в значительной степени подавлены, а гормон снимает это ограничение, способствуя проявлению генетического потенциала клетки.

С целью дальнейшего анализа вопроса в лаборатории Мюллера была предпринята серия работ по исследованию изменений, наступающих в более ранние сроки действия эстрогена. Было установлено (Gorski, 1962; Gorski a. Mueller, 1963), что уже через 2 часа после введения эстрадиола в матке крыс значительно возрастает количество уридинмонофосфата, что приводит к увеличению на 300% количества уридинтрифосфата через 4 часа после начала опыта. При этом сам процесс фосфорилирования нечувствителен к действию гормона.

В следующих работах (Noteboom a. Gorski, 1963a, b) было показано, что в течение первых двух часов после введения эстрадиол не действует на белковый синтез и лишь к четырем часам наблюдается увеличение на 50% включения в белки C^{14}-глицина и H^3-лейцина. В то же время интенсивность включения H^3-цитидина в РНК возрастает на 80% уже через 2 часа после введения гормона, что сопровождается усилением активности РНК-полимеразы. Оказалось, далее, что к двум часам действия эстрадиола пуромицин (5 *мг* на животное) способен блокировать синтез белка до 20% от контроля; однако и в этих условиях он полностью подавляет стимуляцию синтеза РНК эстрадиолом. Авторы делают вывод, что раннее действие эстрадиола на синтез РНК определяется белковым синтезом в то время, когда гормон еще не оказывает видимого влияния на интенсивность всего белкового синтеза. Они считают, что эстрадиол избирательно стимулирует синтез специфических белков, ответственных за реакцию на эстроген.

Дальнейшее исследование вопроса (Ui a. Mueller, 1963a, b) в опытах с применением P^{32} и H^3-уридина при выделении РНК фенольным методом через 1, 2 и 4 часа после введения гормона и осаждении в градиенте сахарозы показало, что эстрадиол вызывает в матке усиление синтеза всех видов РНК. При одновременном введении эстрадиола и актиномицина *D* наблюдается подавление синтеза РНК; то же самое происходит и в контроле.

Если же воспрепятствовать синтезу РНК предварительным введением актиномицина *D*, то эстрадиол не оказывает в дальнейшем характерного стимулирующего действия на синтез белков и фосфолипидов (ранний эффект), в то время как в матке контрольных животных эти процессы протекают в присутствии актиномицина *D* на обычном уровне. Авторы приходят к заключению, что ранний ответ ткани на гормон зависит от синтеза новой РНК (см. также Gorski a. Nicolette, 1963). На основании всех выполненных работ они выдвигают предположение о следующем механизме первичного действия эстрогенов: эстрогены стимулируют в матке синтез некоторых белков, вызывающих индуцирование синтеза новой РНК; новосинтезированная РНК в свою очередь снабжает аппарат белкового синтеза информацией, необходимой уже для дальнейшего распространения первичного гормонального влияния.

Подтверждение взглядов Мюллера в работах других исследователей. Данные Мюллера и сотрудников нашли хорошее подтверждение в работах Гамильтона (Hamilton, 1962, 1963), показавшего, что пуромицин полностью подавляет способность матки крыс отвечать усилением включения C^{14}-глицина в белки при воздействии различными эстрогенами (эстрон, эстриол, 17β-эстрадиол), причем его действие однозначно проявляется в пределах широкой шкалы доз вводимых гормонов (от 0,5 до 10 γ). Однако Гамильтон, который использовал ту же дозу пуромицина (5 *мг* на животное через 1, 2, 3 и 4 часа после введения эстрогенов), не наблюдал частичного сохранения способности к синтезу белка в условиях полного подавления синтеза РНК пуромицином, как это было в работе Ноутбума и Горского. В опытах Гамильтона пуромицин не препятствовал проявлению стимулирующего действия эстрогенов на включение P^{32} в РНК. Гамильтон делает заключение о внутриядерном механизме действия эстрогенов на клетки матки с первичной индукцией синтеза и-РНК и последующим усилением белкового синтеза. Эта точка зрения была поддержана другими учеными (Talwar a. Segal, 1963), показавшими, что актиномицин *D* полностью предупреждает ороговение влагалища у крыс при введении эстрогенов, в то время как пуромицин не оказывает этого действия. Они полагают, что индукция синтеза и-РНК является общим способом первичного действия всех гормонов на органы-мишени (см. также Greengard, Gordon a. Acs, 1963).

Однако в дальнейшем Гамильтон (Hamilton, 1964) обнаружил, что наибольшее подавление синтеза и-РНК и белкового синтеза в тканях матки при действии эстрогена достигается в условиях одновременного введения пуромицина и актиномицина *D*, что, по его мнению, свидетельствует о существовании в матке компонента, чувствительного к пуромицину и не зависящего от актиномицина *D*. Он соглашается с точкой зрения Мюл-

лера и сотрудников, что первичное действие эстрогенов на матку состоит в индукции синтеза небольшой фракции белка, контролирующей ДНК-зависимый синтез РНК и дальнейшую, более значительную активацию белкового синтеза de novo. В следующей работе (Moore a. Hamilton, 1964) высказывается предположение, что самым ранним событием в действии эстрогенов на орган-мишень является репрессия части генетической информации, вследствие чего и начинается синтез РНК.

Применив седиментационный анализ РНК из матки неполовозрелых крыс, которым вводили 17β-эстрадиол, с параллельным гистологическим изучением распределения РНК в клетках, Уилсон (J. D. Wilson, 1963) приводит доказательства того, что эстроген в первую очередь воздействует на и-РНК и т-РНК и лишь позднее — на рибосомальную РНК.

Недавно из матки кастрированных крыс была выделена макромолекулярная фракция, подавляющая активность РНК-полимеразы. Аналогичная фракция, полученная из матки кастрированных крыс, которым предварительно вводили 17β-эстрадиол, не обладала подобным действием; однако предварительное инкубирование со стероидами восстанавливало ее способность к подавлению ферментативной активности (Talwar et al., 1964).

На основании этих данных авторы полагают, что при взаимодействии исследованной фракции с эстрогеном она могла играть роль «рецептора» для фиксации гормона в клетках матки, в то время как в отсутствие эстрогена она является репрессором РНК-полимеразы; при взаимодействии макромолекулярной фракции с гормоном это свойство утрачивается.

Участие других гормонов в генетическом контроле белкового синтеза. Результаты опытов с эстрогенами хорошо согласуются с данными работ Уильямс-Эшмана и сотрудников, полученными при изучении механизмов действия другой группы стероидных гормонов — андрогенов (Williams-Ashman, 1962; Liao a. Williams-Ashman, 1962; Hancock et al., 1962). Как было обнаружено, рибонуклеотидные частицы, изолированные из вентральной простаты крыс, при добавлении в раствор катализируют перенос радиоизотопа от комплекса т-РНК — C^{14}-валин на белок. Частицы из железы кастрированных животных не обладают этой способностью, а предварительное введение крысам тестостерона ее восстанавливает. Было также показано значительное ускоряющее действие предварительного введения гормона животным на включение меченых нуклеозидов — цитидинтрифосфата ($ЦТФ^{32}$) и аденозинтрифосфата ($АТФ^{32}$) в РНК инкубируемой ткани простаты. Уильямс-Эшман и др. делают вывод о возможной роли синтеза и-РНК на матрице ДНК в действии андрогенов на активацию клеток специфической по отношению к ним ткани.

Развивая эти представления, они предпринимают новое исследование (Silverman, Liao a. Williams-Ashman, 1963), в котором показывают, что в отсутствие полиуридиловой кислоты количество фенилаланина, включающегося в белки, в два раза меньше в рибосомах, изолированных из простаты кастрированных крыс, чем в рибосомах крыс, получавших тестотерон. Точно так же добавление полиуридиловой кислоты в большей степени стимулирует перенос аминокислот на рибосомы, изолированные у кастрированных крыс, по сравнению с таким же опытом на крысах, которым вводят гормон. Делается вывод о том, что тестостерон влияет на образование рибосомных комплексов и и-РНК в простате.

К сходным заключениям привели исследования и с другими гормонами. Так, например, Тата (Tata, 1963) обнаружил, что и актиномицин D, и пуромицин препятствуют проявлению стимулирующего влияния тиреоидина на основной обмен у крыс. В других опытах с помощью актиномицина D было показано (Greengard a. Acs, 1962), что кортизон повышает ферментативную активность печени путем активации новообразования ДНК.

Методом седиментационного анализа быстрометящихся фракций нуклеиновых кислот в лаборатории Томкинса было установлено, что гидрокортизон стимулирует синтез различных видов РНК в печени (Garren, Howell a. Tomkins, 1964), в том числе и-РНК, необходимой для синтеза белкового репрессора, действующего, в свою очередь, на и-РНК в цитоплазме (Garren, Howell, Tomkins a. Crocco, 1964). Авторы предполагают, что гормональная регуляция образования ферментов в печени происходит на уровне трансляции (а не транскрипции),— точка зрения, поддерживаемая и другими (Спирин и Белицина, 1965).

Участие гормонов в генетическом контроле формообразовательных процессов. Представления о возможном участии гормонов в генетическом контроле процессов биосинтеза не ограничиваются приведенными выше примерами; они подтверждаются данными, полученными на растительных объектах (Varner a. Chandra, 1964), а также распространяются на обширную область гормональной регуляции формообразовательных процессов. Было показано (Gall a. Callan, 1962), что гонадотропный гормон в два раза усиливает включение H^3-уридина в РНК петель хромосом («ламповых щеток») в ооцитах тритона. Клевер (Clever, 1961, 1963) и Карльсон (Karlson, 1963a, b) изучали действие экдизона — гормона метаморфоза — на пуфы гигантских хромосом слюнных желез у личинок Chironomus tentans. Как известно, пуфы представляют собой участки активного синтеза РНК и белков. Уже через короткое время после введения гормона можно было наблюдать появление одного нового пуфа, на смену которому возникала затем серия пуфов. Клевер и Карльсон предполагают, что экдизон действует непосредственно

на генетический аппарат хромосомы, активируя цепь реакций, вызывающих метаморфоз.

Оценивая данные Клевера, Нейфах (1962) допускает мысль, что в данном случае приводится в действие несколько видоизмененная схема генетического контроля, в которой индуктор не снимает репрессии гена, а активирует его. Другими словами, гормон прямо или посредством цитоплазматического посредника активирует ген-регулятор, а тот в свою очередь активирует серию других генов, лежащих в различных участках хромосом. Такой тип регуляции характерен, по мнению Нейфаха, для ядерной и клеточной дифференцировки у многоклеточных.

Следует сказать, что вопрос о том, что именно лежит в основе гормональной стимуляции роста и размножения клеток — прямая активация синтетических процессов или, наоборот, подавление системы ингибиторов,— до сих пор является дискуссионным. Независимо от конкретных путей реализации этого контроля, сам факт участия гормонов в регуляции активности генов, по-видимому, можно считать доказанным. В последнее время появляется все больше работ, в которых приводятся данные, подтверждающие эту возможность (Garren a Howel, 1963; Korner, 1963; Mauer, 1963; Takao a. Moriyama, 1963; Weill et al., 1963; Wool, 1963; Wool a. Munro, 1963, и др.). В своем обзоре Томкинс и Максвелл (Tomkins a. Maxwell, 1963) также приходят к заключению, что стероидные гормоны, обладающие большим сродством к некоторым белкам, снимают действие репрессора, изменяя его структуру, и тем самым регулируют синтез специфических и-РНК. Учитывая многообразие функций и особенности строения стероидов, есть основания полагать, что во многих реакциях они могут выступать как аллостерические эффекторы (см. Monod, Changeux a. Jacob, 1963; Kidson a. Kirby, 1964; Williams-Ashman, 1964).

Основные вопросы, которые предстоит решить, заключаются в том, насколько универсален такой тип контроля, является ли активация гена гормоном первоначальным этапом его воздействия на клетку, и если это так, то каким образом приводится в действие вся цепь дальнейших процессов, завершающихся делением клетки. Вполне возможно, что в пределах системы регуляции белкового синтеза разные гормоны активируют разные звенья (Segal, 1964), и что этому предшествуют более ранние, еще не изученные события. Неясен еще вопрос о дерепрессорной функции гормонов. Имеются данные о том, что стероиды могут взаимодействовать непосредственно с молекулой ДНК, сродство которой к гидрофобным стероидам (в частности, к эстрогенам) очень велико (Ts'o a. Lu, 1963, 1964). Мюллер подчеркивает важность изучения более отдаленных событий после введения эстрогенов с помощью анализаторов белкового синтеза (Mueller, 1961).

4. ВОПРОС О МНОЖЕСТВЕННОМ ХАРАКТЕРЕ ДЕЙСТВИЯ ЭСТРОГЕНОВ НА КЛЕТКУ

Вышеизложенный материал позволяет присоединиться к мнению тех исследователей, которые допускают существование более чем одного способа воздействия эстрогенов на клетку. Подтверждением этому могут служить данные о множественном характере действия инсулина (Eboue-Bonis et al., 1963; Søvik a. Walaas, 1964). Необходимо, однако, рассмотреть вопрос о соотношении этих способов воздействия.

Не отрицая возможности действия отдельных гормонов на проницаемость клетки, следует признать, что имеющийся экспериментальный материал позволяет считать это действие лишь одним из аспектов гормональной регуляции метаболизма. Что касается эстрогенов, то их влияние на клеточную проницаемость вообще оспаривается (данные Халкерстона), а если и допускается, то как носящее вторичный характер (данные Мюллера).

Признавая бесспорный интерес результатов, добытых в области изучения действия эстрогенов на окислительно-восстановительные процессы, идущие с участием специфических ферментов — трансгидрогеназ, нельзя в то же время закрывать глаза и на факты, противоречащие предлагаемым в этом плане теориям Вилли и Талалая. Так, например, чувствительная к эстрадиолу трансгидрогеназа, занимающая центральное место в гипотезе Вилли, до сих пор не обнаружена в матке крыс и некоторых других млекопитающих. Представления Талалая о коферментной функции эстрогенов идут вразрез с данными об отсутствии превращения эстрадиола в эстрон в тканях матки. Следует сказать, что малоубедителен и сам принцип активации гормоном одной ключевой реакции с образованием больших количеств энергии, положенный в основу каждой из теорий. В известном смысле обе точки зрения являются модификацией прежней «энергетической» теории Буллоу (W. S. Bullough, 1962c) о ключевой роли гексокиназной реакции в регуляции деления клеток, которую автор в настоящее время уже пересмотрел (W. S. Bullough, 1962a). Однако следует еще раз подчеркнуть, что сам факт участия эстрогенов в ферментативных реакциях бесспорен, и этот аспект их действия подлежит дальнейшему тщательному изучению.

Наконец, остается пока еще не самая многочисленная, но наиболее импонирующая группа работ последнего времени, касающихся действия эстрогенов на генетический аппарат клетки. Основной вопрос о возможности гормональной регуляции активности гена, по-видимому, решен положительно, даже если будет показано, что этому предшествуют другие, более ранние события. В этом смысле первоначальный тезис Мюллера (1958) о том, что проблема действия эстрогенов в конечном счете может быть

сведена к проблеме синтеза биополимеров, был сформулирован им совершенно правильно. Пожалуй, здесь будет уместным вспомнить также, насколько справедливой оказалась основная идея теории Суонна об индуктивном действии гормонов на деление клеток (Swann, 1958). Если только что было упомянуто о том, что теории Вилли и Талалая в каком-то смысле развивают линию представлений Буллоу, то можно сказать, что экспериментальные исследования Мюллера продолжают развивать линию Суонна.

Будучи убежден, что главным способом действия гормонов на процессы роста в органах-мишенях является индукция ими синтеза биополимеров путем активации гена (генов), Мюллер, как и Суонн, допускает, что наряду с этим гормоны могут осуществлять и иного рода влияния на клетку, приводящие к менее глубоким, хотя и важным изменениям ее функционирования, облегчающим реализацию основного регуляционного воздействия. Для иллюстрации этих представлений в свое время была предложена схема (Mueller et al., 1958), в которой нашли отражение различные стороны действия гормонов на клетку. Несмотря на то, что многие представления претерпели с тех пор существенные изменения, на этой схеме в целом верно нанесены все три основные группы возможных точек приложения действия эстрогенов, о которых шла речь выше. Поэтому можно закончить главу описанием схемы Мюллера (рис. 17), отметив, что последовательность и характер событий в действительности могут быть значительно сложнее.

В покоящейся клетке часть матриц (*М*) находится внутри барьеров, препятствующих их участию в синтезе биополимеров. Гормон может разрушить барьер (первая точка приложения действия гормона) и сделать тем самым матрицу способной к активному участию в образовании новых белков — ферментов (*Ф*) и новых матриц, то есть «демаскировать» комплекс *М-Ф*. После освобождения матриц их участие в синтезе полимеров контролируется индуктором и антииндуктором, первый из которых способствует, а второй препятствует отделению вновь образовавшегося белка с поверхности матрицы («диссоциация» комплекса *М-Ф*). Освобождение матрицы от белка делает ее способной к синтезу новых количеств нуклеиновых кислот и новых матриц. В этой ситуации гормон может действовать как индуктор или антииндуктор (вторая точка приложения). Вновь образованный фермент может быть впоследствии активирован или инактивирован (третья точка приложения) и тем самым оказывать влияние на уровень каталитических процессов, в которых продукты снова начинают образовывать барьеры, пополнять пул индукторов и антииндукторов или же пул предшественников для синтеза белков и нуклеиновых кислот. Как видно на схеме, здесь всюду действуют обратные связи. Таков в самых общих чертах итог тех

сведений, которые имеются в настоящее время в области изучения механизмов действия эстрогенов, а также ряда других гормонов на реакции внутриклеточного метаболизма. Этот итог свидетельствует о том, что сущность гормональной регуляции размножения клеток до сих пор во многом остается неясной.

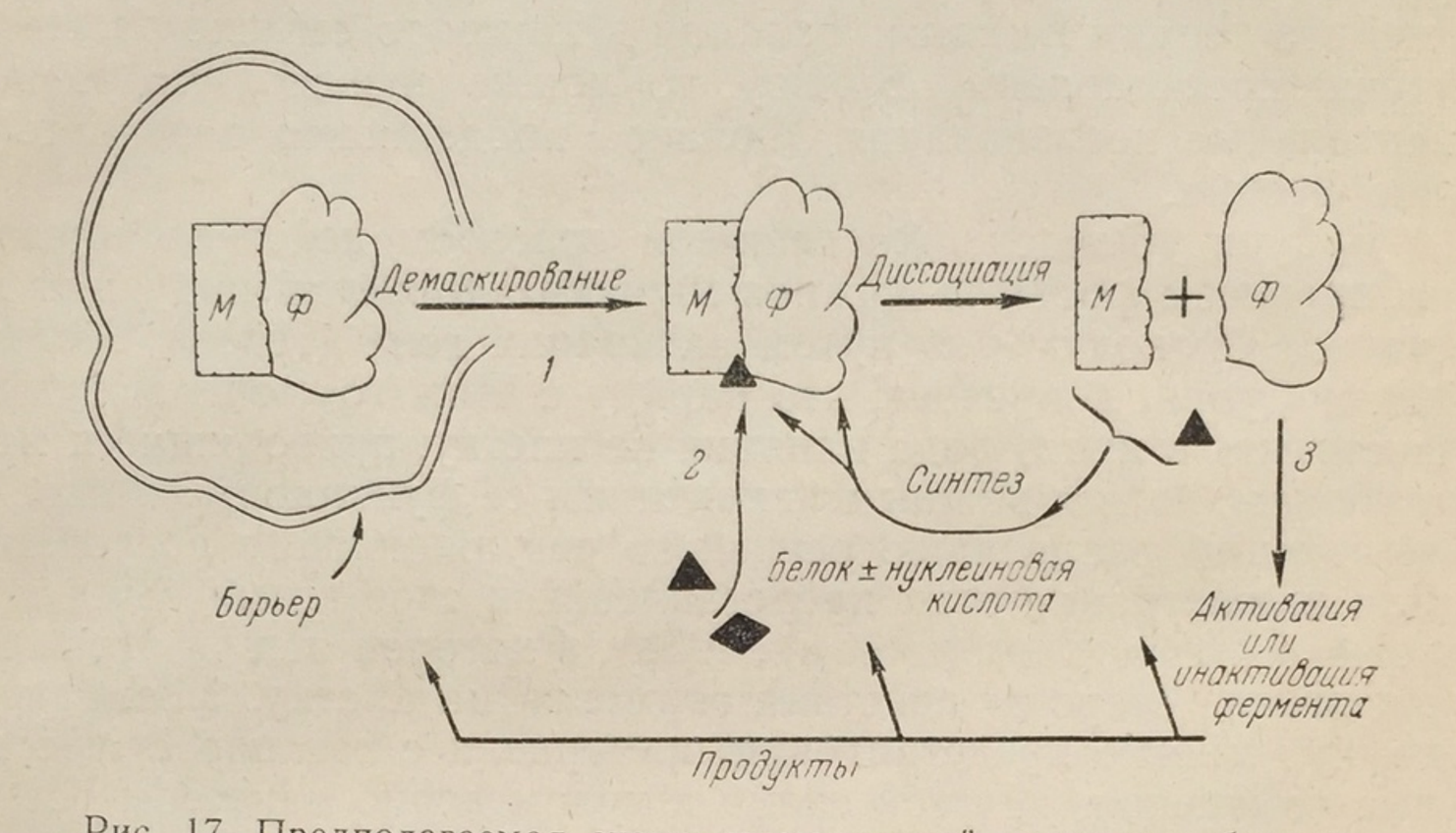


Рис. 17. Предполагаемая схема гормональной регуляции биосинтеза макромолекул (Mueller et al., 1958)

М — матрица; *Ф* — фермент; *1, 2, 3* — возможные точки приложения действия гормона; черный треугольник — индуктор, черный ромб — антииндуктор

Ни одна из разобранных выше концепций, к сожалению, не получила дальнейшего развития, так как отсутствие адекватных методов исследования не позволило своевременно осуществить их экспериментальную проверку. Немаловажную роль в этом сыграла разобщенность биохимического и цитологического направлений в исследованиях. С развитием метода радиоавтографии появилась реальная возможность не только проверить правильность представлений об основных путях воздействия гормонов на деление клеток, но и углубить изучение этого вопроса.

Указанные обстоятельства побудили автора предпринять экспериментальное исследование, посвященное выяснению общих закономерностей гормональной регуляции размножения клеток в тканях сформированного организма. Задача исследования была сознательно ограничена изучением действия одной группы гормонов, а именно, эстрогенов. Этот выбор был продиктован тем, что эстрогены, являясь, как известно, специфическими стимуляторами клеточного размножения в органах воспроизводящей системы, способны в то же время стимулировать деление клеток и в других органах (см. гл. V). Это давало возможность проводить сравнительный анализ их действия на процесс размножения клеток в тканях разного типа.

сведений, которые имеются в настоящее время в области изучения механизмов действия эстрогенов, а также ряда других гормонов на реакции внутриклеточного метаболизма. Этот итог свидетельствует о том, что сущность гормональной регуляции размножения клеток до сих пор во многом остается неясной.

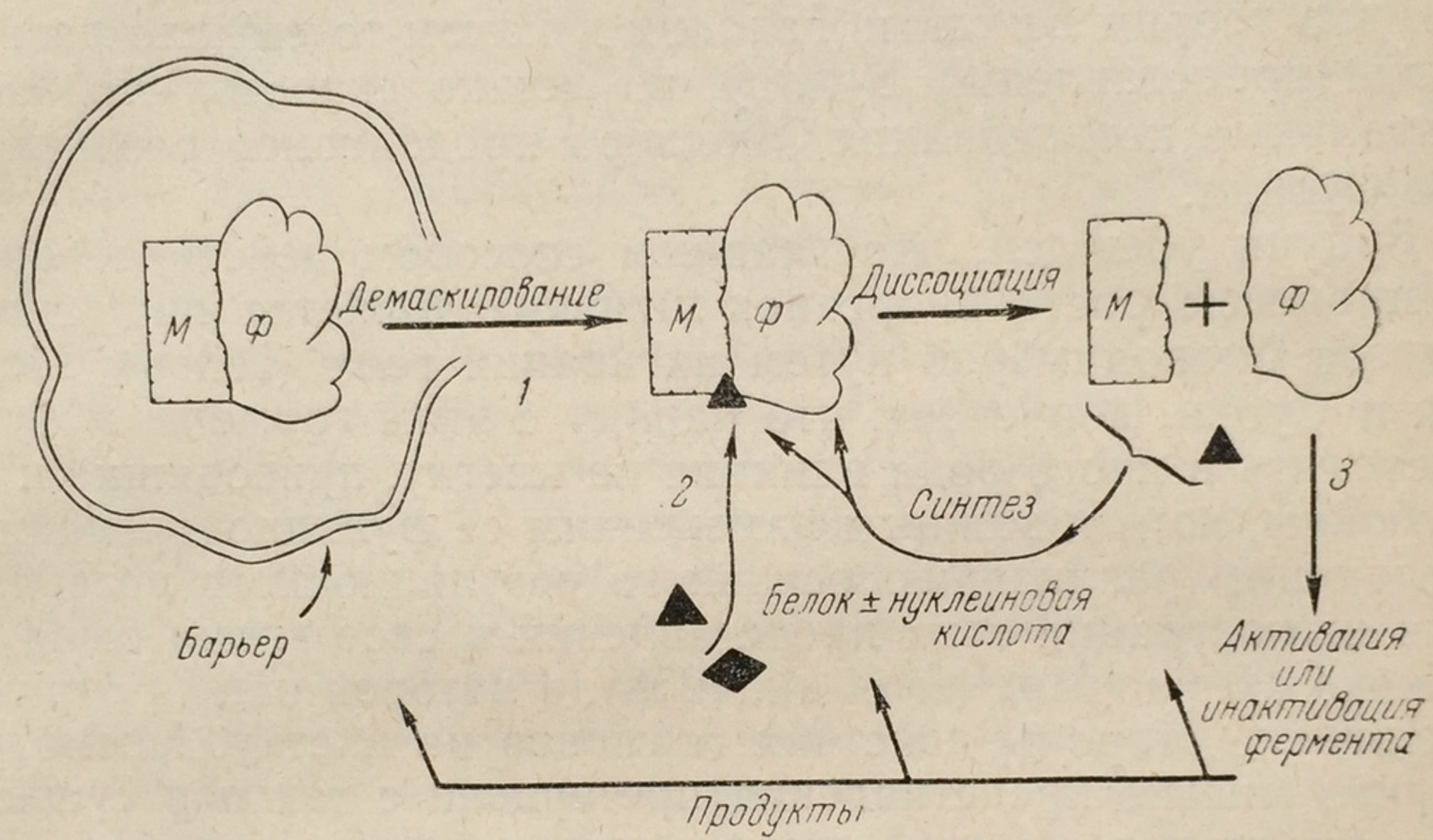


Рис. 17. Предполагаемая схема гормональной регуляции биосинтеза макромолекул (Mueller et al., 1958)

М — матрица; *Ф* — фермент; *1, 2, 3* — возможные точки приложения действия гормона; черный треугольник — индуктор, черный ромб — антииндуктор

Ни одна из разобранных выше концепций, к сожалению, не получила дальнейшего развития, так как отсутствие адекватных методов исследования не позволило своевременно осуществить их экспериментальную проверку. Немаловажную роль в этом сыграла разобщенность биохимического и цитологического направлений в исследованиях. С развитием метода радиоавтографии появилась реальная возможность не только проверить правильность представлений об основных путях воздействия гормонов на деление клеток, но и углубить изучение этого вопроса.

Указанные обстоятельства побудили автора предпринять экспериментальное исследование, посвященное выяснению общих закономерностей гормональной регуляции размножения клеток в тканях сформированного организма. Задача исследования была сознательно ограничена изучением действия одной группы гормонов, а именно, эстрогенов. Этот выбор был продиктован тем, что эстрогены, являясь, как известно, специфическими стимуляторами клеточного размножения в органах воспроизводящей системы, способны в то же время стимулировать деление клеток и в других органах (см. гл. V). Это давало возможность проводить сравнительный анализ их действия на про-

Рассмотрение литературы позволяет выделить две основных точки зрения по вопросу о влиянии эстрогенов на деление клеток в тканях сформированного организма. Согласно одной из них (Буллоу), эстрогены действуют как энергетические стимуляторы деления непосредственно перед вступлением клеток в митоз. Другая точка зрения (Суонн) предполагает, что наряду с этим в специализированных тканях (тканях-мишенях) эстрогены способны вызывать индуктивное переключение всего типа метаболизма клеток на синтез нуклеиновых кислот и белков, необходимых для построения митотического аппарата. Строгие экспериментальные доказательства в пользу каждого из этих представлений отсутствуют.

Непременным условием проведения подобного рода исследований является сопоставление действия эстрогенов на деление клеток в тканях-мишенях и тканях, не обладающих специфичностью по отношению к этой группе гормонов. В последнее время большие успехи достигнуты в изучении механизмов первичного действия эстрогенов на ткани-мишени. Однако полученные результаты относятся только к ранним срокам после введения эстрогенов и не могут быть поставлены в непосредственную связь с их влиянием на деление клеток.

Для выяснения вопроса о путях воздействия эстрогенов на деление клеток в тканях, отличающихся по специфичности реакции на гормон, необходимо применение такого метода исследования, который позволил бы установить точки приложения действия гормона на различных этапах митотического цикла каждой ткани. Этим требованиям в значительной мере отвечает метод радиоавтографического анализа с использованием специфического предшественника ДНК—H^3-тимидина, позволяющий определять продолжительность отдельных периодов митотического цикла и фиксировать изменения клеточной популяции во времени. Несмотря на интенсивное развитие в последние годы исследований в области регуляции митотических циклов, действие эстрогенов (как и других гормонов) в этом плане практически не изучалось. Перечисленные общие соображения обуслови ли специфику и последовательность проведения опытов. Все исследование складывалось из двух основных этапов:

1) подробная характеристика митотического режима и морфологических изменений ткани-мишени и контрольной ткани в условиях нормального и нарушенного баланса эстрогенов в организме;

2) радиоавтографический анализ митотического цикла и кинетики клеточных популяций сравниваемых тканей при действии эстрогенов.

В соответствии с названными этапами, изложение экспериментального материала логически распадается на две части, составляющие содержание гл. VII и VIII, каждой из которых предпослано описание методов и приемов исследования.

Глава VII.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА ТКАНЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ

1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подопытными животными являлись белые беспородные мыши (Mus musculus L.). В опыт брали половозрелых самок весом не менее 17—20 *г* (что соответствует возрасту 3—3,5 месяца). С целью уменьшить индивидуальные колебания величин, характеризующих митотический режим, соблюдали максимальную стандартизацию условий содержания и проведения опытов. Забой животных производили обезглавливанием, как правило, в утренние часы суток. Всего в этой части исследований было использовано более 1200 мышей.

В качестве ткани-мишени был выбран эпителий слизистой оболочки матки. Как известно, матка принадлежит к числу органов воспроизводящей системы, обладающих большой чувствительностью к эстрогенам. Периодические сдвиги эстрогенного баланса в организме, обусловливаемые функциями гипофиза и яичников (эстральный цикл), вызывают в тканях матки комплекс закономерно повторяющихся изменений, хорошо выраженных морфологически. Особенно характерные изменения претерпевает слизистая оболочка матки, подвергающаяся на протяжении эстрального цикла интенсивной физиологической регенерации.

Этот процесс связан с постоянным размножением клеточных элементов, наиболее четко выявляемым в эпителии матки, что делает его удобным объектом для параллельного изучения морфологических изменений и митотического режима при действии эстрогенов.

В качестве контрольной ткани был выбран эпителий роговой оболочки, или роговицы глаза. Этот объект широко используется для изучения самых различных сторон митотического режима. Подвергаясь постоянному обновлению, эпителий роговицы обладает значительным митотическим индексом. Важным обстоятельством является ограниченность функционального значения роговицы: будучи наружной частью оптического ап-

парата глаза, она защищает подлежащие ткани. Полагают, что именно в силу функциональной ограниченности роговицы отдаленное влияние на ее митотический режим общих факторов бывает выражено с большой отчетливостью (Уткин, 1958). Эпителий роговицы составляет у мышей и крыс более 50% веса всей роговицы. Размножение клеток происходит в базальном слое эпителия. Роговица лишена кровеносных сосудов, и все метаболиты попадают в нее из жидкостей, омывающих ее поверхности (подробно см. Pirie a. van Heyningen, 1956; Лопашов и Строева, 1963).

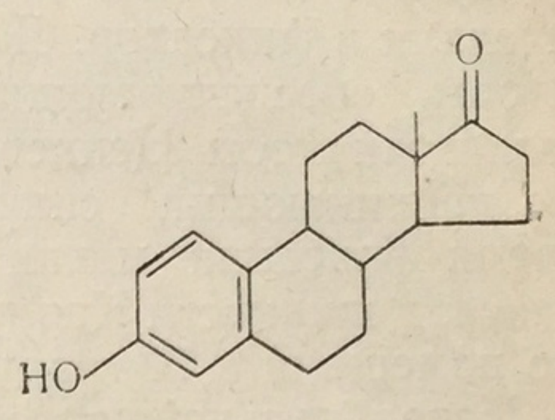


Рис. 18. Формула эстрона

Основные приемы исследования биологического действия эстрогенов. Для определения стадий эстрального цикла мыши применялся метод влагалищных (вагинальных) мазков. Как известно, циклические изменения функции яичников вызывают ответные изменения во всех органах половой системы, в том числе в стенке влагалища (vagina), что отражается на его содержимом. Поэтому каждой стадии эстрального цикла соответствует определенный клеточный состав влагалищного мазка (см. Кабак, 1945). У крысы и мыши продолжительность эстрального цикла колеблется от 4 до 6 дней. Весь цикл подразделяется на следующие основные стадии: диэструс (dioestrus), или стадия покоя; проэструс (prooestrus) — предтечка; эструс (oestrus) — течка и метаэструс (metaoestrus) — период после течки.

Для установления срока беременности отбирали самок с точно зарегистрированным временем спаривания. С этой целью самцов предварительно рассаживали по одному и поздно ночью подсаживали к ним самок. Через несколько часов у самок можно было обнаружить во влагалище плотную белую пробку — сгусток секрета придаточных желез мужского полового аппарата; во влагалищном мазке присутствовали сперматозоиды.

Исследование действия половых гормонов, вводимых извне, производили всегда на кастрированных животных, чтобы исключить собственный источник этих гормонов в организме и сделать экспериментальный материал более однородным.

С момента кастрации до начала введения эстрогенов мышей выдерживали в течение 20—30 дней для стабилизации нового гормонального баланса и проверки его на содержание эстрогенов во избежание регенерации яичника.

В опытах использовался продажный препарат эстрона (эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол-17-она) — одного из природных эстрогенов, вырабатываемых в организме (рис. 18). Гормон вводили под кожу спины в растворе абрикосового или персикового масла, которое слегка подогревали. Ежедневная однократная

доза на мышь составляла 25 единиц (*IE*) [1] продажного препарата (соответствует 2,5 γ) в 0,1 *мл* масла. Поскольку после введения гормона должно было пройти время, достаточное для проявления его действия (см. гл. V), мышей забивали всегда через 24 часа после последней инъекции.

Вскрыв брюшную полость мыши, вырезали ножницами матку с яичниками и растягивали на узкой полоске плотной бумаги (во избежание сильного сокращения тканей), после чего сразу же опускали в фиксатор. Для фиксации применяли сулемовые фиксаторы, обеспечивающие хорошее окрашивание всех тканей матки: жидкость Ценкера и жидкость Максимова, а также быстро проникающий спиртовый фиксатор — жидкость Карнуа. Время фиксации матки в сулемовых фиксаторах составляло 4 часа, в жидкости Карнуа — 30 мин. После промывания объекта его помещали в 70-градусный спирт.

Перед дальнейшей обработкой в каждом случае вырезали бритвой среднюю часть одного из рогов матки, чаще правого, и после обычной подготовки заливали в парафин. Из залитых кусочков приготовляли поперечные серийные срезы через рог матки толщиной 7—8 μ, которые после проведения через ксилол и спирты окрашивали и, обезводив, заключали в бальзам.

Для окрашивания препаратов матки в целях подсчета митозов использовали главным образом гематоксилин по Караччи или гематоксилин Майера, иногда с докраской эозином. В случае необходимости дифференцировать соединительнотканные элементы применяли метод Маллори.

Для приготовления препаратов роговицы у мыши извлекали оба глазных яблока, которые погружали на 1 час в жидкость Карнуа, а затем, промыв в спиртах, переносили в 70-градусный спирт. В дальнейшем один глаз помещали в чашку Петри с дистиллированной водой. Глазными ножницами осторожно вырезали роговицу по краю радужной оболочки и, промыв ее еще раз в дистиллированной воде, окрашивали гематоксилином Майера или по Караччи. Затем из роговицы готовили тотальный препарат, для чего после обычной проводки через спирты и карболксилол ее помещали в чашку с ксилолом и надрезали по краям ножницами так, чтобы она разделилась на четыре сектора. Это обеспечивало в дальнейшем равномерное расположение роговицы между предметным и покровным стеклами. Непосредственно после заключения роговицы в бальзам на покровное стекло помещали на некоторое время небольшой груз.

Основные приемы исследования митотического режима тканей. Просмотр препаратов производили под иммерсией (окуляр 7×, объектив 90×) в микроскопе системы «Люмипан». Подсчет

[1] *IE* — интернациональная единица специфической активности эстрогенов, создаваемой 0,1γ препарата. Утверждена на Международной конференции по стандартизации половых гормонов в 1935 году (см. Hanč, 1959).

митозов осуществляли с непременной регистрацией фаз клеточного деления, отмечая одновременно их топографическое распределение по площади эпителия обеих тканей. С целью охватить весь процесс митотического деления учитывали следующие фазы митоза: раннюю профазу, профазу, метафазу, анафазу и телофазу, а также ядра в состоянии реконструкции (см. рис. 1—2). Параллельно с этим вели наблюдения за морфологическими изменениями изучаемых тканей.

В эпителии матки митотический индекс определяли двумя способами: относили число митозов к единице площади или к общему числу клеток (см. гл. I, раздел 3). В первом случае в каждом четвертом срезе рога матки (считая от его верхней части) под рисовальным аппаратом Эдингера при увеличении в 178 раз зарисовывали контуры эпителия, выстилающего полость матки, производя 10—15 таких зарисовок. На каждом рисунке отмечали расположение митозов для данного среза с указанием фазы деления. Затем контуры рисунка переводили на стандартную бумагу, вырезали рисунок ножницами и взвешивали его на торзионных весах. Зная вес 1 *см*^{2} бумаги, определяли площадь эпителия, а затем вычисляли митотический индекс как число митозов на единицу площади. Этот способ удобен тем, что позволяет судить о топографии митозов в ткани. Его применяли главным образом в тех сериях опытов, где изучали параллельно динамику митотического режима и морфологию матки.

В других опытах был использован более распространенный способ выражения митотического индекса в промилле (число митозов на тысячу клеток). Для этого подсчитывали, как и в первом случае, число митозов в эпителии полости матки в десяти срезах и, кроме того, общее число клеток эпителия в трех — четырех срезах, а затем определяли отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и полученное отношение умножали на тысячу. Для подсчета числа митозов в эпителии роговицы в окуляр микроскопа вставляли прямоугольную диафрагму, ограничивавшую поле зрения определенной величины (0,01 *мм*^{2}). На покровное стекло препарата роговицы тушью наносили взаимноперпендикулярные линии. По обе стороны каждой из этих линий последовательно просматривали все поля зрения с регистрацией числа митозов. Таким способом учитывали митозы как центральных, так и периферических участков эпителия. В среднем на роговицу просматривали более 140 полей зрения, причем одно поле содержало приблизительно 190 клеток базального слоя эпителия (в каждом случае определяли число клеток в трех полях зрения и выводили среднее). Применение диафрагмы позволяло вычислять митотический индекс не только в промилле, но и на единицу площади эпителия, если возникала необходимость сопоставления получаемых результатов с данными других работ.

Для большинства приводимых в работе данных вычисляли величины ошибок средних арифметических ($\pm m$). С целью более строгого определения степени этой достоверности устанавливали вероятность случайного различия средних величин (P) по методу Фишер — Стюдента; различия считали достоверными при $P \leqslant 0{,}01$.

Отдельные методические приемы будут описаны в ходе изложения материала.

2. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ И ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ НА ПРОТЯЖЕНИИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА [2]

Эстральный цикл и его гормональная обусловленность. Эстральный цикл млекопитающих выражается в ритмической смене периодов течки и покоя, регулируемой поступлением в кровь гормонов передней доли гипофиза и яичников. Яичники продуцируют два вида гормонов — эстрогены и прогестерон, секреция которых связана с определенными этапами функционирования органа: первых — с ростом и созреванием фолликулов (отсюда — название фолликулин), второго — с образованием и развитием желтого тела. Периодичность в функционировании яичников (овариальный цикл) обусловлена согласованным взаимодействием гормонов яичника и двух гонадотропных гормонов гипофиза: фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ).

Усилиями экспериментаторов (см. Эскин, 1951; J. W. Everett, 1961; Greep, 1961; Purves, 1961; Лазарев, 1963, и др.) вскрыты основные принципы осуществления и авторегуляции овариального цикла (рис. 19).

Под влиянием ФСГ в обоих яичниках начинается созревание фолликулов, которые по мере роста усиленно секретируют эстрогены (фолликулин — рис. 19, *1*). Высокий уровень фолликулина в крови, характерный для периода течки (эструса), приводит к торможению секреции ФСГ (рис. 19, *2*) и одновременно — к стимуляции секреции ЛГ (рис. 19, *3*), под влиянием которого в конце течки происходит овуляция. В это время фолликулы лопаются и выбрасывают яйцеклетки, попадающие в яйцеводы. В яичниках начинается лютеинизация фолликулов и превращение их в желтые тела, секретирующие прогестерон (рис. 19, *4*). В случае, если оплодотворения не происходит, яйцеклетки погибают в яйцеводах, и наступает состояние покоя (диэструс). Прогестерон угнетает лютеинизирующую функцию гипофиза (рис. 19, *5*), что влечет за собой атрофию желтых тел; наблюдается усиление фолли-

---

[2] См. Епифанова, 1958, 1959а, 1961б, в.

кулостимулирующей функции (рис. 19, *6*), и цикл начинается сначала.

Таким образом, на протяжении эстрального цикла имеет место подъем содержания эстрогенов в крови в период, предшествующий течке, и снижение их концентрации при переходе к диэструсу.

Морфологические изменения в матке грызунов во время эстрального цикла. Эти изменения хорошо изучены и описаны в ряде руководств, однако в них отсутствует количественная характеристика митотического режима эпителия матки и приводятся лишь данные визуальных наблюдений, часто не соответствующие действительности (см., например, Сахаров и др., 1952). Обычно отмечают наличие большого числа клеточных делений в эпителии матки в проэструсе, иногда — в эструсе и отсутствие их в диэструсе и метаэструсе. На внезапное появление большого числа митозов в проэструсе обратила внимание Рихтер (1949), изучавшая гистофизиологические особенности эпителия половых путей самок крыс и мышей. Она подчеркивает, что митотическое деление ядер протекает интенсивно и в эструсе, но ослабевает и продолжает снижаться в метаэструсе.

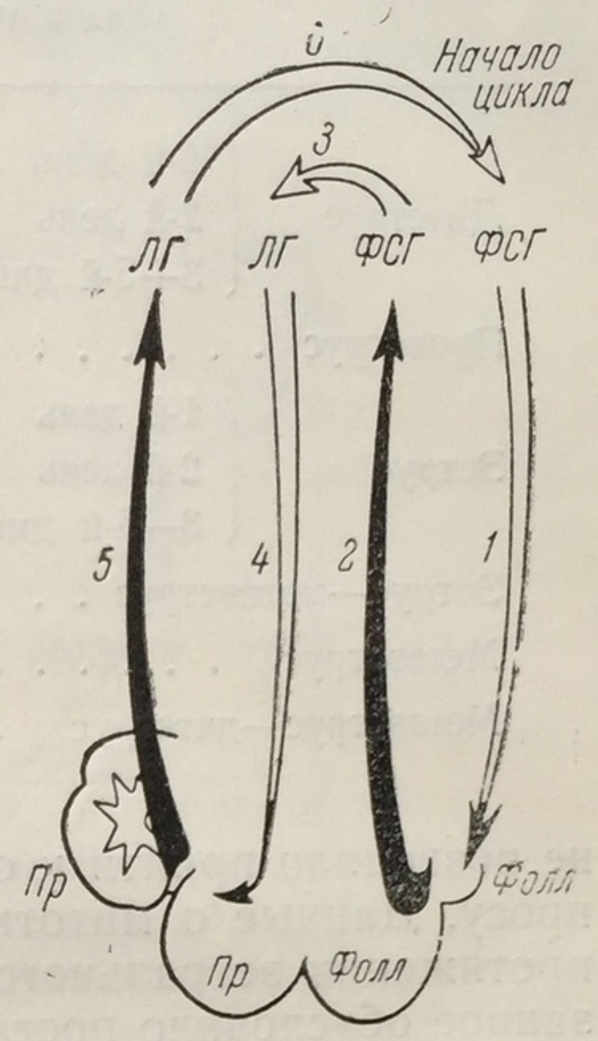


Рис. 19. Схема осуществления овариального цикла и его авторегуляции (Лазарев, 1963)

Белые стрелки — стимуляция, черные стрелки — угнетение; *ЛГ* — лютеинизирующий гормон; *ФСГ* — фолликулостимулирующий гормон; *Пр* — прогестерон; Фолл. — фолликулин

Что касается количественных исследований митотического режима эпителия матки на протяжении эстрального цикла, то они крайне немногочисленны, получены на небольшом материале и вследствие этого противоречивы. К моменту проведения настоящей работы имелись лишь единичные данные по указанному вопросу.

Буллоу (W. S. Bullough, 1946) показал, что число митозов в эпителии матки у мышей увеличивается к концу диэструса и в метаэструсе, то есть дважды на протяжении эстрального цикла. В опытах Алова (1957а) максимум клеточных делений в эпителии матки мышей приходился на стадию диэструса, а наименьшее их количество отмечалось в эструсе. К сожалению, в работе более длительно протекающие стадии (диэструс) не изучались достаточно дробно (по дням). Из всех перечисленных авторов только Рихтер проводила сопоставление митотической активности эпителия матки с его функциональным состоянием. Однако отсутствие количественного учета митозов в ее исследованиях

Таблица 4

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей на разных стадиях эстрального цикла

Стадия цикла		Число животных	*MI* (на ед. пл.)
Диэструс	1-й день	10	0,95±0,14
	2-й день	5	0,00±0,00
	3—5-й дни	5	0,02±0,006
Проэструс		6	0,86±0,02
Эструс	1-й день	5	0,07±0,01
	2-й день	5	0,004±0,001
	3—5-й дни	7	0,006±0,001
Эструс—метаэструс		6	0,23±0,08
Метаэструс		6	0,61±0,1
Метаэструс—диэструс		10	0,69±0,1

не позволяло прийти к определенному заключению по этому вопросу. Данные о митотическом режиме эпителия роговицы на протяжении эстрального цикла в литературе отсутствуют. Сказанное обусловило постановку двух опытов, описываемых ниже. Опыты проведены на 120 самках весом 20—25 *г*. Стадии эстрального цикла определяли при ежедневном двукратном взятии у мышей влагалищных мазков в течение 10—11, а в некоторых случаях до 20 дней, после чего животных обезглавливали. Последний мазок у каждой мыши был взят непосредственно перед забоем.

Частое взятие влагалищных мазков позволило установить, что большинство подопытных мышей циклирует регулярно, то есть у них можно было наблюдать последовательное наступление всех стадий эстрального цикла. Однако вариации во времени протекания той или иной стадии у различных животных оказались довольно значительными. Продолжительность всего цикла также варьировала, составляя в среднем 8 дней.

Задачей первого опыта являлась подробная характеристика митотического режима эпителия матки с параллельным описанием морфологических изменений. Поэтому опыт был проведен на большом числе животных, с детальным изучением по дням каждой стадии цикла и учетом всех переходных этапов. Матку фиксировали в жидкости Ценкера и окрашивали гематоксилином и по Маллори, а часть препаратов — по Фёльгену и по Браше. В каждом случае зарисовывали контуры матки и митотический индекс определяли на единицу площади эпителия.

В задачу второго опыта входило сопоставление митотического режима эпителия матки и эпителия роговицы на протя-

жении эстрального цикла. В этом опыте учитывали только основные стадии цикла. Обе ткани фиксировали в жидкости Карнуа и окрашивали гематоксилином Майера. Митотический индекс вычисляли в промилле от общего числа клеток.

Результаты первого опыта представлены в табл. 4 и изображены графически на рис. 20, где по оси ординат отложены значения митотического индекса (*MI*), по оси абсцисс — стадии

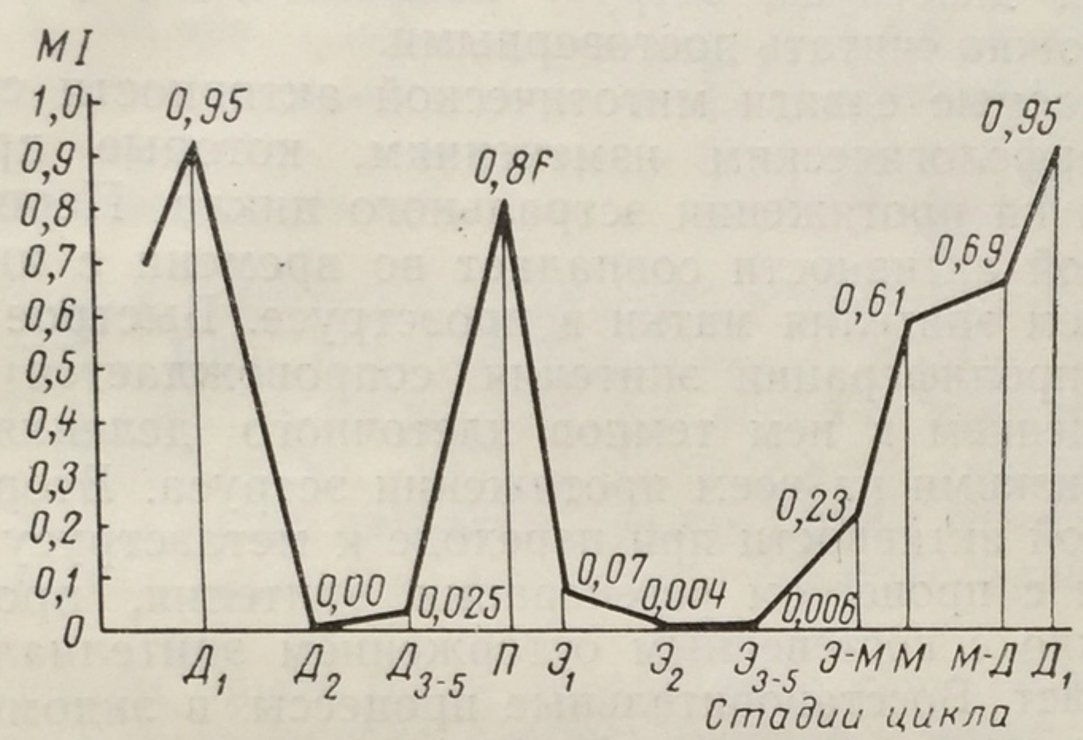


Рис. 20. Митотический режим в эпителии матки у мышей на разных стадиях эстрального цикла

$Д_1$—1-й день диэструса; $Д_2$—2-й день диэструса; $Д_{3-5}$—3—5-й дни диэструса; *П* — проэструс; $Э_1$—1-й день эструса; $Э_2$—2-й день эструса; $Э_{3-5}$—3—5-й дни эструса; *Э—М* — эструс — метаэструс; *М* — метаэструс; *М — Д* — метаэструс — диэструс

эстрального цикла (основные и переходные) с соблюдением по возможности временны́х отношений между ними. При построении кривой объединили близкие между собой показатели животных, забитых на 3—5-й дни диэструса и соответственно в те же дни эструса.

Как показывает график, митотическая активность в эпителии матки неодинакова на разных стадиях эстрального цикла и выражается двухвершинной кривой с максимумом клеточных делений в проэструсе и в начале диэструса.

По окончании диэструса, на всех сроках которого, кроме первого дня, митотический индекс близок к нулю (*MI*=0,025), в эпителии матки наступает резкое увеличение числа клеточных делений (в проэструсе *MI*=0,86), сменяющееся столь же быстрым его падением к началу эструса. В первый день эструса митотический индекс равен 0,07, а в дальнейшем он еще больше снижается, практически не изменяясь затем на протяжении всей течки (*MI*=0,004 и 0,006). При переходе к метаэструсу наступает постепенное увеличение митотического индекса (*MI*=0,23), которое продолжается вплоть до первого дня ди-

эструса, когда число клеточных делений достигает второго пика ($MI=0{,}95$). Но уже на второй день диэструса митотический индекс равен нулю.

Ввиду отсутствия трансгрессий между величинами митотических индексов, из которых выводили средние для групп с наибольшими (первый день диэструса, проэструс) и наименьшими (2—5-й дни диэструса, эструс) показателями, установленные различия можно считать достоверными.

Наблюдаемые сдвиги митотической активности соответствуют тем морфологическим изменениям, которые претерпевает эндометрий на протяжении эстрального цикла. Первый подъем митотической активности совпадает во времени с интенсивным разрастанием эпителия матки в проэструсе. Быстрое окончание процессов пролиферации эпителия сопровождается столь же резким падением в нем темпов клеточного деления, которые остаются низкими на всем протяжении эструса. Второй подъем митотической активности при переходе к метаэструсу совпадает во времени с процессом регенерации эпителия, протекающим одновременно с постепенным отторжением эпителиальных клеток в просвет. Восстановительные процессы в эндометрии протекают медленнее, чем пролиферативные разрастания эпителия матки в проэструсе, и подъем митотической активности также происходит постепенно. После завершения реконструкции эпителия матка приходит в состояние диэструса. Митотическое деление клеток в эпителии на этой стадии почти не наблюдается.

В процессе исследования было установлено, что вагинальные мазки не всегда точно отражают циклические изменения, происходящие в матке. Так, фаза пролиферации наступает в матке, по-видимому, раньше, чем во влагалище, и, когда картина мазка еще соответствует диэструсу, эндометрий оказывается уже типичным для проэструса. На это обращали внимание и другие авторы, например Рихтер (1949). По окончании течки изменения во влагалище, наоборот, предшествуют процессу реконструкции эпителия матки. Мазок характерен для диэструса, в то время как матка фактически еще не приходит в состояние покоя. Этим, по-видимому, и объясняется высокая митотическая активность эпителия матки в первый день диэструса, устанавливаемого по вагинальному мазку.

Таким образом, проведенный опыт показал, что на протяжении эстрального цикла в эпителии матки у мышей имеет место двукратный подъем числа митозов: первый в проэструсе, когда происходит разрастание эндометрия перед овуляцией, и второй в метаэструсе — диэструсе, при смене эпителиального пласта в случае несостоявшегося оплодотворения. Эти данные были подтверждены Лагучевым (1962), также получившим двухвершинную кривую митотической активности в эпителии

Таблица 5

Средний митотический индекс в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей на разных стадиях эстрального цикла

Стадии цикла	Число животных	*MI* (‰)	
		эпителий матки	эпителий роговицы
Диэструс, 2—5-й дни	5	0,6±0,2	4,1±1,2
Проэструс	5	26,9±5,4	5,0±1,6
Эструс	6	0,7±0,2	4,9±1,5
Метаэструс—диэструс, 1-й день	8	16,3±1,9	4,5±0,5

матки у мышей с максимумом делений в проэструсе и в первый день диэструса. Еще позднее Берталанфи и Лау (Bertalanffy a. Lau, 1963) в опытах на крысах подтвердили полученные нами результаты (Епифанова, 1958). По-видимому, расхождение с упоминавшимися ранее данными Буллоу (1946) объясняется тем, что в его опытах несколько иначе учитывались стадии эстрального цикла.

В следующем опыте было предпринято сопоставление в тех же условиях митотического режима эпителия матки и эпителия роговицы. Результаты этого опыта, полученные при исследовании одних и тех же животных, представлены в табл. 5 и на рис. 21. При выведении средних величин митотических индексов учитывали только основные стадии эстрального цикла.

Как следует из таблицы и графика, в этом опыте кривая митотической активности в эпителии матки имеет двухвершинный характер с наибольшим количеством делений в проэструсе и при переходе от метаэструса к диэструсу. В то же время в эпителии роговицы подобных колебаний не отмечается, и митотический индекс остается почти на одном уровне на всех стадиях цикла.

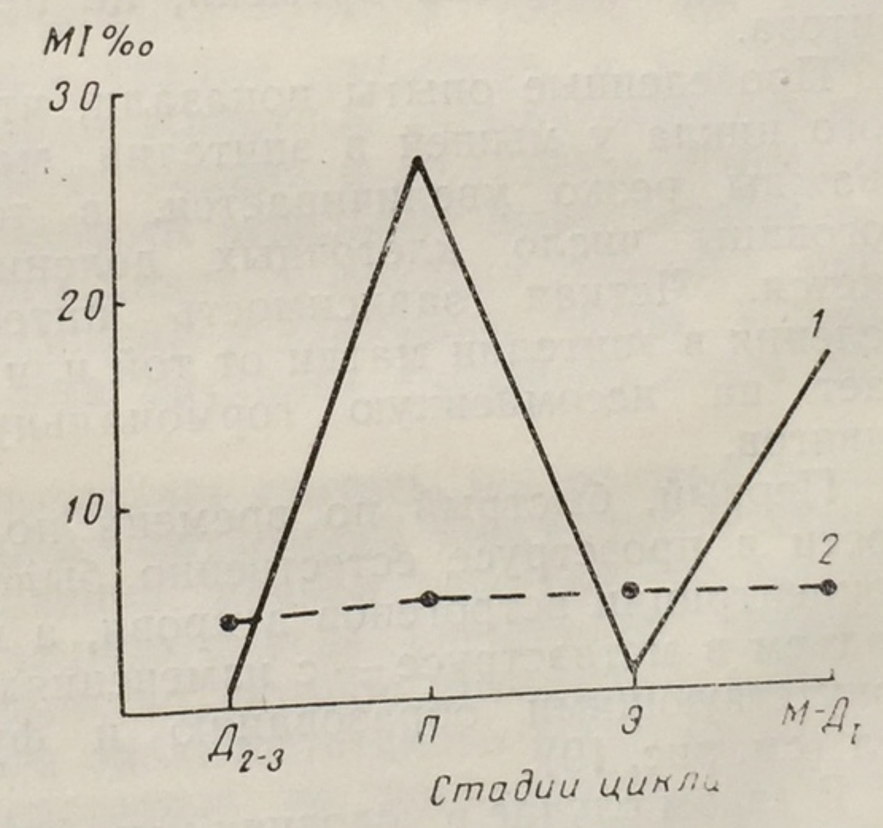


Рис. 21. Митотический индекс в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей на разных стадиях эстрального цикла.
1 — эпителий матки; *2* — эпителий роговицы. Обозначения стадий цикла те же, что и на рис. 20

Никаких морфологических изменений в эпителии роговицы на протяжении эстрального цикла не обнаружено.

Для дальнейшего анализа вопроса по данным каждого из опытов был вычислен коэффициент фаз, представляющий собой отношение суммы ранних фаз митоза к сумме поздних фаз ($K_ф = \frac{РП + П + М}{А + Т + ПТ}$, где РП — ранняя профаза, П — профаза, М — метафаза, А — анафаза, Т — телофаза и ПТ — поздняя телофаза). В обеих тканях на всех стадиях цикла величина $K_ф$ была больше единицы ($K > 1$), что указывает на обычное преобладание ранних фаз митоза, характерное для процесса клеточного деления в тканях сформированного организма (см. Уткин, 1958; Доброхотов, 1959а, и др.). Незначительные колебания величины $K_ф$ и одинаковый процент метафаз в эпителии матки на всех стадиях цикла позволяют считать, что продолжительность отдельных фаз митоза практически не меняется, а наблюдаемые подъемы митотической активности являются результатом вступления в митоз большего числа клеток в проэструсе и в метаэструсе. Однако определение коэффициента фаз дает лишь косвенные доказательства в пользу той или иной возможности протекания процесса; для достоверного суждения об изменении длительности митоза по сдвигу соотношения его фаз нужны исследования с частой фиксацией материала на протяжении отрезка времени, не превышающего длительность митоза.

Проведенные опыты показали, что на протяжении эстрального цикла у мышей в эпителии матки митотический индекс дважды резко увеличивается, в то время как в эпителии роговицы число клеточных делений практически не изменяется. Четкая зависимость интенсивности митотического деления в эпителии матки от той или иной стадии цикла указывает на несомненную гормональную обусловленность этих сдвигов.

Первый, быстрый по времени подъем митотической активности в проэструсе естественно было связать с повышением концентрации эстрогенов в крови, а второй, более постепенный подъем в метаэструсе — с изменениями гормонального баланса, сопутствующими образованию и функционированию желтых тел (см. рис. 19).

В таком случае в условиях угнетения функции яичников можно было ожидать снижения митотической активности эпителия матки. Следующий опыт, в котором исследовали только матку, посвящен проверке этого предположения.

3. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ В УСЛОВИЯХ НАРУШЕНИЯ ЭСТРАЛЬНЫХ ЦИКЛОВ [3]

Способы нарушения эстральных циклов. Расстройство эстральных циклов легко вызвать в эксперименте различными стрессорами (см. гл. III, раздел 2), но эти нарушения, как правило, кратковременны и могут носить внеовариальный характер. Однако можно получить стойкие изменения цикла в сторону удлинения диэструса вплоть до полного прекращения циклирования (см. обзор Leathem, 1961).

К числу факторов, угнетающих функцию яичников, относятся злокачественные опухоли. Известно, что рост опухоли приводит к значительным нарушениям обменных процессов в организме, которые распространяются и на его гормональный баланс. Уже давно многими исследователями (см. Ларионов, 1938, и др.) были обнаружены в яичниках крыс и мышей, подвергавшихся действию канцерогенных веществ, атрофические изменения, сходные с теми, которые имеют место при старении. Эти результаты были подтверждены и данными клиники.

Специальное исследование эстральных циклов у мышей после внутримышечной прививки им карциноматозной опухоли было проведено Манертом (Mahnert, 1927), который наблюдал двухфазные изменения цикла. Первая фаза, продолжавшаяся около двух недель после прививки, заключалась в преждевременном наступлении и удлинении периода течки. Во второй фазе, напротив, удлинялась стадия диэструса, и к 20—30-му дню после прививки опухоли животные прекращали циклировать. В более поздней работе Эскина и др. (1955) отмечаются отклонения в степени активности отдельных форм эстрогена на протяжении менструального цикла у женщин, больных раком молочной железы. О нарушении эстрального цикла у белых крыс при экспериментальных опухолях головного мозга сообщил Денисенко (1963).

Все вышеизложенное позволяет считать, что наличие в организме животного очага злокачественного роста небезразлично для нормального циклирования, причем расстройство эстральных циклов является в данном случае следствием угнетения функции яичников. Большинство авторов приходит к выводу о тормозящем влиянии очага злокачественного роста на деление клеток в тканях, непосредственно не пораженных опухолью. Так, Козлов (1953, 1957) и Уткин (1955) наблюдали снижение числа митозов в эпителии роговицы у мышей после подкожной прививки аденокарциномы Эрлиха. В опытах Уткина аналогичный результат был получен и при развитии у мышей опухолей, вызванных введением фактора молока. Дьердьяи и Хаднадь (Gyergyay u. Hadnagu, 1957a) отмечают тормозящее влияние

[3] См. Епифанова, 1959б, 1961б, в.

перевиваемой саркомы на митотическую активность эпителия роговицы и аденокарциномы Эрлиха — на деление клеток в кишечнике у мышей. Сходные данные были получены на крысах Гололобовой (1958), обнаружившей снижение интенсивности клеточного размножения в эпителии роговицы, кишечника и кожи у крыс с привитой саркомой М-1.

Следует сказать, что упомянутые исследователи не считают специфическим воздействие опухолевого очага на митотическую активность тканей (см. Козлов, 1957, и др.). По мнению Уткина, злокачественная опухоль вызывает нарушение общих механизмов, контролирующих клеточное деление. Дьердьяи и Хаднадь связывают наблюдаемое ими снижение митотической активности при опухолевом росте со степенью кахексии организма.

Наряду с этим в литературе имеются данные о стимулирующем действии перевиваемых опухолей на деление клеток, например, в печени (Annau et al., 1951; Duplan, 1956; Malmgren, 1956; Naora a. Naora, 1957; Fuchs et al., 1961) и других органах (Пужака, 1963), а также об отсутствии влияния опухоли на митотическую активность тканей, расположенных вне очага злокачественного роста (Fuchs u. Jung, 1960).

В связи с вышеизложенным были поставлены опыты по изучению эстральных циклов и митотического режима в эпителии матки у мышей после прививки опухоли. В опыт было взято 125 половозрелых самок весом в среднем 20 *г*, которые были разбиты на две подопытные группы (по 50 мышей в каждой) и одну контрольную. Для получения подкожных опухолей использовали асцитную форму аденокарциномы Эрлиха (0,2 *мл* при каждой прививке). Мыши подопытных групп различались между собой сроком роста опухолей — соответственно 10 и 20 дней. Принимая во внимание обнаруженный ранее факт зависимости темпов роста аденокарциномы от места ее прививки (Епифанова, 1956), асцитную жидкость вводили половине животных каждой подопытной группы в область лопатки, а другой половине в область бедра. Контрольным животным прививку опухоли не производили. Матку фиксировали в жидкости Ценкера и окрашивали гематоксилином по Караччи и гематоксилин-эозином. Митотический индекс вычисляли на единицу площади эпителия. Большинство контрольных и подопытных мышей до прививки опухоли циклировало регулярно. В процессе исследования не было отмечено различий в циклировании мышей в зависимости от места прививки опухоли, что позволило суммировать материал, принимая во внимание только сроки роста опухолей. Средний вес 10-дневных опухолей составлял 1080 *мг*, 20-дневных — 4045 *мг*.

В табл. 6 приведены данные о количестве мышей в диэструсе к моменту забоя и о средней продолжительности диэструса на разных сроках развития опухоли.

Таблица 6

Число животных в диэструсе к моменту забоя и средняя продолжительность диэструса на различных сроках роста опухоли

Характеристика группы	Число животных в группе	Число животных в диэструсе к моменту забоя				Средняя продолжительность диэструса в днях после прививки опухоли
		по вагинальному мазку		по мазку и по состоянию эндометрия		
		абс.	%	абс.	%	
Контрольные животные	23	15	65,2	14	60,8	5,3±0,8
Животные с 10-дневной опухолью	42	42	100,0	38	90,4	4,6±0,4
Животные с 20-дневной опухолью	35	35	100,0	33	94,3	12,1±0,7

Из таблицы следует, что уже на 10-й день после прививки опухоли все мыши переходят в состояние диэструса, в то время как процент таких мышей в контроле равен 65,2. Принимая во внимание, что вагинальные мазки не всегда точно отражают циклические изменения в матке (см. предыдущий раздел), дополнительно был вычислен процент животных в диэструсе не только по картине вагинального мазка, но и по состоянию эндометрия. Этот процент оказался равным на 20-й день после прививки опухоли 94,3, на 10-й день — 90,4, в контроле — 60,8 (см. табл. 6).

Средняя продолжительность диэструса у животных с 10-дневными опухолями составляла 4,6±0,4 дня (считая с момента прививки). Это небольшое по сравнению с контролем снижение не является достоверным (P = 0,23). У мышей с 20-дневными опухолями средняя продолжительность диэструса увеличилась до 12,1±0,7 дня, что реально превышает соответствующие показатели как для контрольных животных, так и для животных с 10-дневными опухолями (P в обоих случаях <0,0001).

Увеличение по мере роста опухолей количества мышей, находящихся в диэструсе, несомненно, свидетельствовало о подавлении у них эстрального цикла, но оно не позволяло судить о степени этого угнетения. Вполне правомерно было допустить, что часть подопытных животных находилась к моменту забоя на стадии обычного, физиологического диэструса, вслед за которым могла наступить течка. Требовалось выяснить, в течение какого времени до забоя мыши различных групп находились в состоянии диэструса. Результаты этих вычислений сведены в табл. 7.

Таблица 7

Количество мышей с различной продолжительностью диэструса до забоя

Характеристика группы	Число животных в группе	Процент животных с продолжительностью диэструса до забоя		
		1—5 дней	6—10 дней	11—17 дней
Контрольные животные . . .	14	57,0	43,0	—
Животные с 10-дневной опухолью	38	71,0	29,0	—
Животные с 20-дневной опухолью	33	15,0	15,0	70,0

Как показывает таблица, 57% контрольных животных находилось перед забоем в диэструсе в течение 1—5 дней, у 43% диэструс продолжался свыше 6 дней. У мышей с 10-дневными опухолями эти цифры составляют соответственно 71 и 29%. Таким образом, количество мышей, продолжительность диэструса у которых перед забоем не превышала 1—5 дней, в группе животных с 10-дневными опухолями оказалось даже выше, чем в контроле. Это позволяет считать вполне вероятной возможность циклирования известной части мышей на этом сроке развития опухоли.

Иная картина наблюдалась у животных с 20-дневными опухолями. Здесь только у 15% всех мышей диэструс продолжался перед забоем в течение 1—5 дней и у такого же количества — в течение 6—10 дней. Основная масса животных (70%) не циклировала перед забоем от 10 до 17 дней. Анализ динамики угнетения эстрального цикла у мышей с 20-дневными опухолями показал, что к 10-му дню развития у них опухолей число животных, находившихся в диэструсе в течение 1—5 дней, было почти таким же, как и в контроле (61%). Следовательно, нарушение эстрального цикла проявляется на более поздних сроках развития опухоли.

Таким образом, проведенные опыты показали, что подкожная прививка мышам аденокарциномы Эрлиха приводит к определенным нарушениям эстральных циклов, выражающимся в удлинении стадии диэструса вплоть до полного прекращения циклирования. Эти изменения могут быть отчетливо констатированы на 20-й день после прививки опухоли. Динамика изменений числа митозов на протяжении эстрального цикла у контрольных животных представлена на рис. 22. Ход кривой в целом подтверждает полученные ранее результаты (см. рис. 20).

Поскольку после прививки опухоли мыши перестают циклировать, при сопоставлении митотических индексов в эпителии матки у подопытных и контрольных животных учитывали только тех мышей, которые находились в диэструсе. При этом

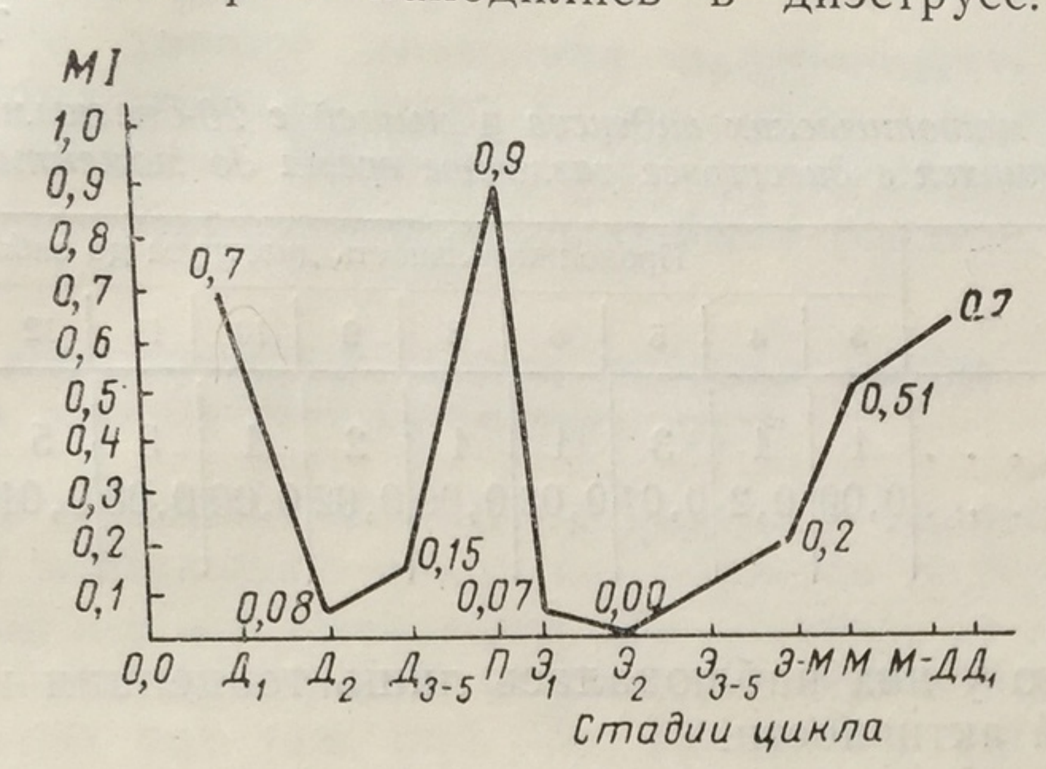


Рис. 22. Митотический индекс в эпителии матки у мышей контрольной группы из опыта с нарушением эстрального цикла

исключали данные по митотической активности контрольных мышей в первый день диэструса, когда матка еще не приходит в состояние покоя, и митотический индекс очень высок. Результаты этих вычислений представлены в табл. 8.

Таблица 8

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей на разных сроках после прививки опухоли

Характеристика группы	Число животных	*MI* (на ед. пл.)
Контрольные животные	14	0,150±0,05
Животные с 10-дневной опухолью	38	0,074±0,02
Животные с 20-дневной опухолью	33	0,040±0,01

Как следует из таблицы, средний митотический индекс у контрольных животных равен 0,15±0,05. На 10-й день после прививки опухоли он уменьшается вдвое, однако это различие не является достоверным (P = 0,16). К 20-му дню после прививки митотический индекс снижается еще больше; это уменьшение оказывается достоверным по сравнению с величиной митотического индекса у контрольных животных (P = 0,007). В то же время разница между митотическими индексами у мышей с 10- и 20-дневными опухолями недостоверна (P = 0,23).

Таким образом, на 20-й день после прививки опухолей у

мышей происходит отчетливое уменьшение митотической активности эпителия матки. Однако прямой зависимости снижения митотического индекса от длительности диэструса обнаружить не удалось (табл. 9). Что касается мышей с 10-дневными

Таблица 9

Сопоставление митотических индексов у мышей с 20-дневными опухолями, находившихся в диэструсе различное время до момента забоя

Показатели	Продолжительность диэструса до забоя, дни											
	3	4	5	6	8	9	10	11	12	14	15	17
Число животных . . .	1	1	3	1	1	2	1	3	5	3	1	11
Средний *MI*	0,00	0,2	0,01	0,02	0,00	0,02	0,00	0,08	0,01	0,13	0,00	0,02

опухолями, то у них наблюдалась лишь тенденция к снижению митотической активности.

Проведенный анализ соотношения ранних и поздних фаз митоза в эпителии матки показал отсутствие существенных различий в величине $K_ф$ у контрольных и подопытных животных. Следовательно, снижение митотической активности в результате прививки опухоли происходило не за счет ускорения митоза, а вследствие уменьшения числа клеток, вступающих в деление.

Результаты этой части исследования позволяют прийти к выводу о том, что прививка мышам аденокарциномы Эрлиха вызывает снижение митотической активности в эпителии матки, отчетливо обнаруживающееся на 20-й день после прививки опухоли.

Полученные данные подтверждали результаты работ тех авторов, которые наблюдали уменьшение числа митозов в других тканях мышей и крыс после прививки опухолей. Расстройство вплоть до полного прекращения эстральных циклов у мышей с привитыми опухолями свидетельствовало о снижении концентрации эстрогенов в крови. Это подтверждало предположение о том, что эстрогенам принадлежит важная роль в регуляции митотического режима эпителия матки. В частности, вполне правомерно было связать первый подъем митотической активности в эпителии именно с повышением концентрации эстрогенов в крови.

Однако данные, полученные в этой части исследования, не позволяли объяснить все наблюдаемые сдвиги числа митозов в эпителии матки только изменением содержания в крови эстрогенов. По-видимому, ход кривой в целом мог зависеть от включения в процесс регуляции митотического режима других гормональных факторов. Об этом свидетельствовало, например,

быстрое снижение митотической активности в эпителии матки у мышей в проэструсе, когда содержание эстрогенов в крови еще продолжало нарастать, или увеличение числа митозов в метаэструсе при одновременном снижении концентрации эстрогенов в крови (см. рис. 20 и 21).

Полученные данные позволили предположить возможное участие гормона желтого тела в регуляции митотического режима эпителия матки. Проверке этого предположения были посвящены опыты, излагаемые в следующем разделе.

4. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

Как было показано, в эпителии матки у мышей дважды на протяжении эстрального цикла наблюдается подъем числа митозов. Второй подъем начинается при переходе от эструса к метаэструсу, когда происходит овуляция с последующим образованием желтых тел (см. рис. 19). Поскольку эти события непосредственно предшествуют увеличению числа митозов в эпителии матки, казалось логичным связать второй подъем митотической активности эпителия с функцией развивающегося желтого тела. Это предположение нуждалось в экспериментальной проверке, так как, согласно существующему мнению, желтые тела у крыс и мышей становятся функционально активными лишь после спаривания или некоторых искусственных вмешательств (см. Эскин, 1951; J. W. Everett, 1961; Young, 1961, и др.). В связи с вышеизложенным в задачу исследования входила характеристика митотического режима матки у мышей на ранних сроках беременности, когда происходит естественная активация желтых тел, и содержание прогестерона в крови становится максимальным (Телегди и др., 1964).

Изучению митотического режима у беременных животных посвящено сравнительно немного работ, уже упоминавшихся в гл. V, причем исследовали главным образом поздние сроки беременности, когда возрастает содержание эстрогенов в крови. При этом в органах-мишенях обычно наблюдали увеличение числа митозов.

Так, Лейн (Lane, 1940) провел обширное исследование по определению митотической активности фолликулярного аппарата яичников у беременных крыс и обнаружил подъемы и спады числа делящихся клеток в области z granulosa; эти изменения он объясняет сдвигами в количестве гонадотропинов, секретируемых передней долей гипофиза и плацентой. Лэдман (Ladman, 1954) показал увеличение числа клеточных делений в передней доле гипофиза у мышей начиная с 9—10-го дня беременности, что, по его мнению, обусловлено повышенным количеством циркулирующих в крови эстрогенов. Лагучев (1959а)

наблюдал подъем митотической активности эпителия молочных желез у мышей на четвертые и особенно на восьмые, 15 и 18-е сутки беременности.

С другой стороны, по данным Алова (1957б), чрезмерное повышение концентрации эстрогенов в крови у мышей во время беременности действует угнетающе на деление клеток в ряде органов, не связанных непосредственно с половой системой (эпителий роговицы, языка, кишечника).

Таблица 10

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей на различных сроках беременности

2-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	8-е сутки
0,206±0,090 (15)*	0,282±0,050 (9)	0,005±0,001 (8)	0,000±0,00 (9)

* В скобках указано число животных

Перечисленные работы, как это следует из их содержания, позволяют судить лишь о роли эстрогенов в регуляции деления клеток и не освещают вопроса об участии в этом процессе гормона желтого тела. Для решения этого вопроса были поставлены специальные опыты. Исследование проводили на мышах весом 20—25 *г*; всего под опытом находилось 200 самок.

У самок предварительно исследовали эстральный цикл, и в стадии раннего эструса подсаживали их к самцам. Показателем спаривания служило наличие вагинальной пробки (см. раздел 1). Покрытых самок забивали на вторые, третьи, пятые и восьмые сутки беременности.

Матку, яйцеводы и яичники беременных мышей фиксировали в жидкости Ценкера. Поперечные серийные срезы через рог матки окрашивали гематоксилином по Караччи. Митотический индекс выражали числом митозов на единицу площади эпителия.

Сроки беременности уточняли по стадиям развития зародышей, для чего, кроме матки, резали серийно яйцеводы. Стадии развития идентифицировали по таблицам Соботта (Sobotta, 1895, 1903, 1911) и Буркхарда (Burckhard, 1900). Исследование вагинальных мазков показало, что уже на третьи сутки после спаривания все подопытные мыши переходят в состояние диэструса. На вторые сутки после спаривания диаметр рога матки значительно меньше, чем в эструсе. В яйцеводах в это время можно обнаружить зародыши на стадии двух бластомеров. Митотический индекс в эпителии матки на этом сроке беременности равен 0,206±0,09 (табл. 10). Как было показано

ранее (см. рис. 20 и 21), митотический индекс у нормальных мышей в момент спаривания (то есть в эструсе) близок к нулю.

На третьи сутки после спаривания в эндометрии развиваются характерные прегравидарные[4] изменения, которые специфичны для активной лютеиновой фазы яичника и известны под названием «прогестиновой пролиферации» (см. Кабак, 1945; Эскин, 1951, и др.). В яйцеводах обнаруживаются зародыши на стадии 8—16 бластомеров, что указывает на 48—60-часовую беременность. Митотический индекс в эпителии матки равен 0,282±0,05; он мало меняется в течение прошедших суток.

На пятые сутки после спаривания в полости рога матки свободно лежат бластоцисты, располагающиеся в антимезометральной, реже в центральной части просвета. Митотический индекс в эпителии матки к этому времени снижается до 0,005± ±0,001 (различия по сравнению с третьими сутками достоверны: $P<0,0001$). К началу восьмых суток после спаривания клеточное деление в эпителии отсутствует.

Таким образом, у беременных мышей наблюдается некоторый подъем митотической активности в эпителии матки на вторые и третьи сутки беременности, по сравнению с обычной митотической активностью в эструсе и снижение ее до очень низких величин уже на пятые сутки. Вскоре после этого срока начинается инволюция полости матки с постепенной резорбцией эпителия.

Как уже было сказано, на вторые и третьи сутки беременности митотический индекс в эпителии матки равен соответственно 0,206 и 0,282; эти значения очень близки к величине митотического индекса (0,23) у небеременных мышей при переходе от эструса к метаэструсу, то есть в те же сроки после овуляции (см. рис. 20). Это показывает, что активация желтых тел после спаривания не отражается на митотической активности эпителия матки и, следовательно, нет оснований связывать подъем митозов в метаэструсе с функцией желтых тел. Известно, что содержание «свободного» прогестерона в плазме крови у мышей и крыс значительно возрастает на седьмые — восьмые сутки беременности (Forbes a. Hooker, 1957), однако эпителий матки в это время фактически уже резорбируется.

Данные, полученные в опытах с изучением митотической активности эпителия матки на ранних сроках беременности, не подтвердили предположения об участии гормона желтого тела в регуляции митотического режима эпителия матки у мышей на протяжении эстрального цикла, то есть в нормальных физиологических условиях. Таким образом, если первый подъем числа митозов в эпителии находил удовлетворительное объяснение в предварительном повышении концентрации эстрогенов в крови, то причины второго подъема по-прежнему оставались неясными.

[4] От латинского graviditas — беременность.

Для дальнейшего исследования роли эстрогенов в регуляции митотического режима эпителия матки были предприняты опыты с их экзогенным введением кастрированным животным в различных условиях. Результаты этих экспериментов составляют содержание следующего раздела.

5. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ И ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

В задачу этой части исследования входил главным образом выбор дозы и таких условий введения мышам эстрогена, которые позволяли бы постоянно воспроизводить хорошо выраженный и достаточно стойкий эффект стимуляции клеточных делений в эпителии матки и одновременно стимулировали бы митотическую активность эпителия роговицы.

Как уже сообщалось в гл. V, многократное увеличение митотического индекса в эпителии матки у мышей и крыс при кратковременном введении эстрогенов (1—3 инъекции) наблюдали разные исследователи (W. S. Bullough, 1946; Gelfant, Meyer a. Ris, 1955; Алов, 1957а, б, и др.). При этом максимальный эффект после однократного введения эстрогена отмечался через 24—36 час., а к 48 час. митотический индекс снижался, и эпителиальная ткань в дальнейшем приходила в исходное состояние. В отношении эпителия матки мышей это было подтверждено электронномикроскопическими исследованиями (рис. 23) (Nilsson, 1958a, b, c, d; 1959c).

В опытах Буллоу при двукратном введении мышам по 25 γ эстрона митотический индекс в эпителии матки был ниже, чем при однократном; однако это можно объяснить слишком большой дозой гормона. Хотя между исследователями до сих пор существуют расхождения в оценке оптимальной дозы каждого из эстрогенов (см. Emmens, 1962), имеющиеся данные позволяют считать, что максимальная стимуляция деления клеток в органах воспроизводящей системы мыши достигается при дозах 0,1—1,0 γ 17β-эстрадиола или 1,0—10,0 γ эстрона. Несколько меньший, но тем не менее отчетливый стимуляционный эффект наблюдается в пределах значительно более широкой шкалы доз (Dirscherl et al., 1948; Tice, 1961). Интересно, что в отношении других изменений в матке, например увеличения ее веса, эстрадиол также оказывается в 10 раз активнее эстрона; на третьем месте стоит еще один природный эстроген — эстриол.

Данные о действии эстрогенов на деление клеток в эпителии роговицы в литературе отсутствуют.

Во всех опытах в качестве эстрогена использовали эстрон (см. рис. 18). На основании имеющихся данных о его эффективности при введении мышам была выбрана доза 2,5 γ.

Для нахождения оптимальных условий введения гормона, которые отвечали бы поставленной задаче, было проведено два опыта по определению митотического индекса в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей при разной продолжительности действия эстрона. В первый опыт было взято 30 половозрелых самок весом в среднем 20 *г*, которых кастрировали за 22 дня до введения эстрона (см. гл. VI). Мыши были разбиты на пять групп по шесть животных в каждой. В первую группу входили контрольные мыши, которых не подвергали гормональному воздействию; им вводили под кожу спины 0,1 *мл* масла и забивали через 24 часа после инъекции. Животным второй, третьей и четвертой групп производили однократную подкожную инъекцию 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла и забивали их соответственно через 24, 36 и 48 час. после введения гормона. Животным пятой группы эстрон вводили дважды с интервалом в 24 часа и забивали их через 24 часа после второй инъекции. Матку фиксировали в жидкости Карнуа, и поперечные срезы через рог окрашивали гематоксилином Майера. Митотический индекс выражали в промилле к общему числу клеток. Результаты первого опыта представлены в табл. 11.

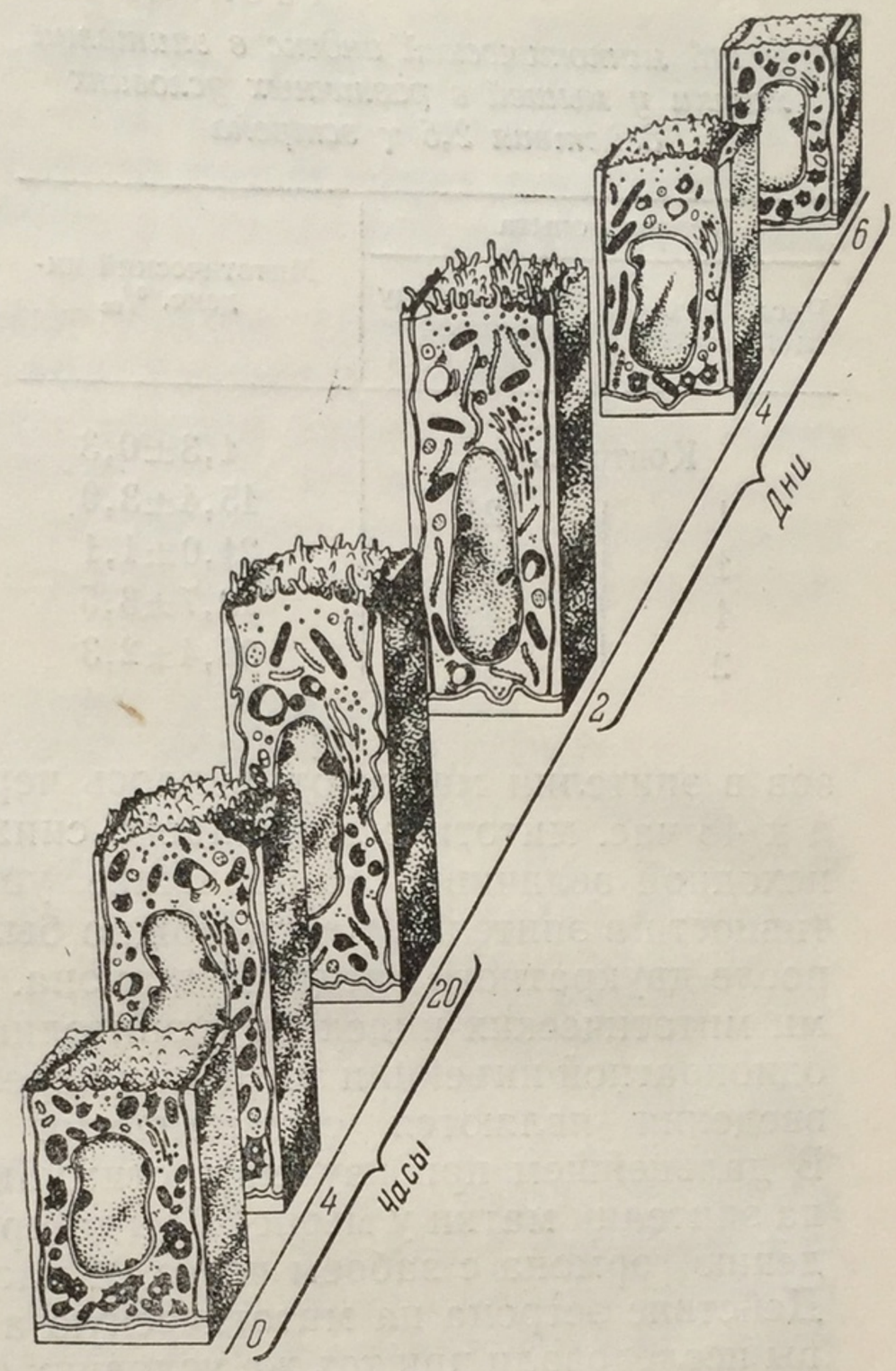


Рис. 23. Схема изменения клеток эпителия матки кастрированной мыши в различные сроки после однократного введения 0,1 γ 17β-эстрадиола (Nilsson, 1959c)

Снизу вверх — сроки после инъекции

Как следует из данных таблицы, число митозов в эпителии матки кастрированных мышей незначительно ($MI = 1{,}3 \pm 0{,}3‰$). Многократное увеличение митотического индекса в эпителии

ждения опти-
овий введе-
которые от-
оставленной
проведено
определению
индекса в
ки и эпите-
у мышей
одолжитель-
ия эстрона.
ит было взя-
релых самок
ием 20 *г*, ко-
ировали за
едения эстро-
). Мыши бы-
а пять групп
отных в каж-
о группу вхо-
льные мыши,
подвергали
му воздейст-
дили под ко-
мл масла и
ерез 24 часа
ции. Живот-
третьей и чет-
п производи-
ную подкож-
ю 2,5 γ эстро-
масла и заби-
оответственно
и 48 час. пос-
гормона. Жи-
ятой группы
или дважды с интервалом в 24 часа и забивали их
а после второй инъекции. Матку фиксировали в жид-
ва, и поперечные срезы через рог окрашивали гема-
Майера. Митотический индекс выражали в промил-
у числу клеток. Результаты первого опыта представ-
. 11.
дует из данных таблицы, число митозов в эпителии
ированных мышей незначительно ($MI = 1{,}3 \pm 0{,}3‰$).

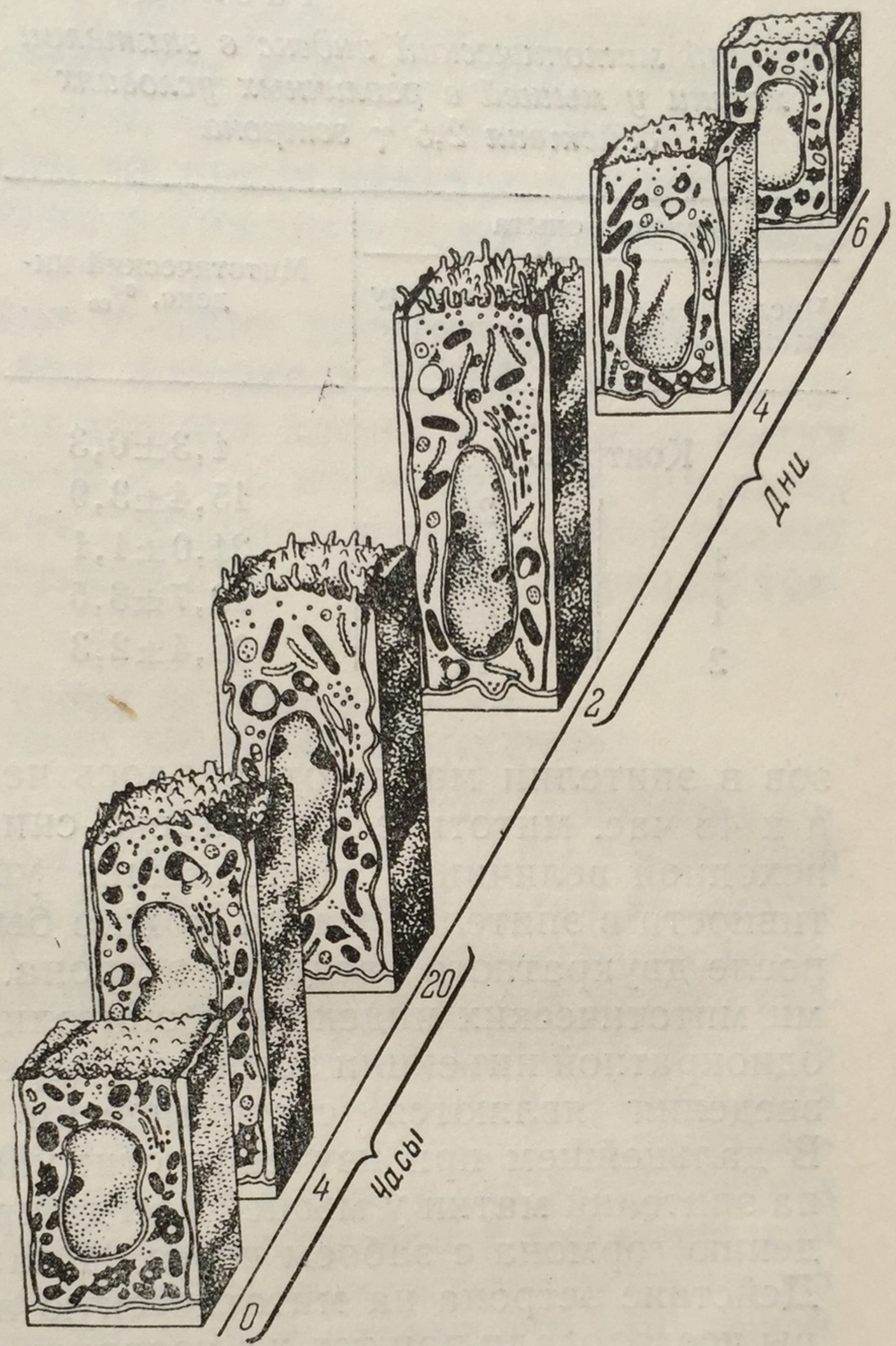


Рис. 23. Схема изменения клеток эпителия матки кастрированной мыши в различные сроки после однократного введения 0,1 γ 17β-эстрадиола (Nilsson, 1959c)

Снизу вверх — сроки после инъекции

Таблица 11

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей в различных условиях действия 2,5 γ эстрона

Условия опыта		Митотический индекс, ‰
Число инъекций эстрона	Время между инъекцией и забоем, часы	
Контроль		1,3±0,3
1	24	15,4±3,9
1	36	21,0±1,1
1	48	12,7±3,5
2	24	28,4±2,3

матки у мышей по сравнению с контролем наблюдалось при всех исследованных условиях действия эстрона (величина P во всех случаях была меньше 0,0001). Однако через 24 часа после однократной инъекции эстрона имели место большие колебания между величинами митотических индексов у отдельных животных. После однократного введения гормона наибольшее число митозов в эпителии матки отмечалось через 36 час. после инъекции, а к 48 час. митотический индекс снижался, не достигая, однако, исходной величины. Наибольшее увеличение митотической активности в эпителии матки можно было наблюдать через 24 часа после двукратного введения эстрона. Различия между величинами митотических индексов в эпителии матки через 36 час. после однократной инъекции эстрона и через 24 часа после двукратного введения являются статистически достоверными (P=0,003). В дальнейшем при изучении стимулирующего действия эстрона на эпителий матки у мышей всегда прибегали к двукратному введению гормона с забоем через 24 часа после второй инъекции. Действие эстрона на митотическую активность эпителия роговицы исследовали при тех же условиях опыта. Во второй опыт было взято 10 кастрированных мышей, половине из которых произвели двукратную подкожную инъекцию 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла, а другой половине в те же сроки вводили только масло. Мыши были забиты через 24 часа после последней инъекции. В этом опыте фиксировали в жидкости Карнуа матку и глаза. Срезы через рог матки и тотальные препараты роговиц окрашивали гематоксилином Майера. Результаты второго опыта представлены в табл. 12.

Таблица 12

Средний митотический индекс в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей при введении 2,5 γ эстрона

Характеристика группы	*MI*, ‰	
	эпителий матки	эпителий роговицы
Контроль . . .	1,6±0,3	4,6±0,5
Опыт	14,0±1,6	7,0±0,6

Из данных таблицы следует, что после двух инъекций эстрона число митозов увеличивается в

обеих исследованных тканях, причем в эпителии матки — в 8,2 раза ($P<0,0001$), а в эпителии роговицы — в 1,5 раза ($P=0,01$). Результаты опыта показывают, что эпителий роговицы у мышей более чувствителен к экзогенному введению эстрогенов, чем к сдвигам их содержания в организме на протяжении эстрального цикла. В то же время никаких морфологических изменений клеток эпителия роговицы при введении эстрона не наблюдается.

Таким образом, выбранные условия проведения опыта отвечали поставленной задаче: они позволяли одновременно получать эстрогенную стимуляцию деления клеток в эпителии матки и в эпителии роговицы у одного и того же животного, что давало в дальнейшем возможность проводить параллельный анализ особенностей реакции на эстроген каждой из исследуемых тканей.

6. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ЭСТРОГЕНОВ [5]

Общая задача этой части работы заключалась в попытке создания такой экспериментальной модели, которая бы в известной мере отражала митотический режим эпителия матки на протяжении эстрального цикла. С этой целью предполагалось насыщать организм кастрированной мыши в течение некоторого времени эстроном (путем повторных инъекций), а затем прекращать его введение, имитируя таким образом сдвиги в содержании эстрогенов в крови нормально циклирующих мышей. Сопоставление митотического режима эпителия матки и морфологических изменений в эндометрии подопытных животных с аналогичными показателями у мышей на соответствующих стадиях эстрального цикла должно было служить критерием надежности выбранной модели. В случае успеха подобный путь исследования способствовал бы выяснению некоторых важных особенностей регулирующего действия эстрогенов на деление клеток в ткани-мишени. Исследование эпителия роговицы в этих опытах не проводилось, поскольку в его митотическом режиме не было обнаружено существенных изменений на протяжении эстрального цикла.

В гл. V были сообщены данные о тормозящем действии повторных инъекций эстрогенов на деление клеток в различных тканях. При повторном введении мышам эстрона в дозе 25 γ с интервалами в 12 час. Буллоу (W. S. Bullough, 1946) наблюдал снижение митотического индекса в эпителии матки почти до нуля уже после трех инъекций и сохранение его в дальнейшем на таком же низком уровне (было сделано шесть инъекций). Однако, как уже отмечалось, Буллоу использовал в своих опытах большую дозу эстрона, и наблюдавшиеся им изменения митотической активности эпителия матки трудно трактовать в интересующем

[5] См. Епифанова, 1959 г. 1961а, б, в.

нас плане; кроме того, он не исследовал, как отражается на делении клеток прекращение инъекций эстрона. В опытах Гелфанта, Мейера и Риса (Gelfant, Meyer a. Ris, 1955) митотический индекс в эпителии матки крыс был ниже после трех инъекций 0,1 γ 17 β-эстрадиола, чем после двух инъекций, хотя и оставался высоким; более отдаленные сроки действия гормона не изучались. В этой части исследований нами было поставлено три опыта. В задачу первого входило изучение митотического режима эпителия матки на разных сроках после введения эстрона.

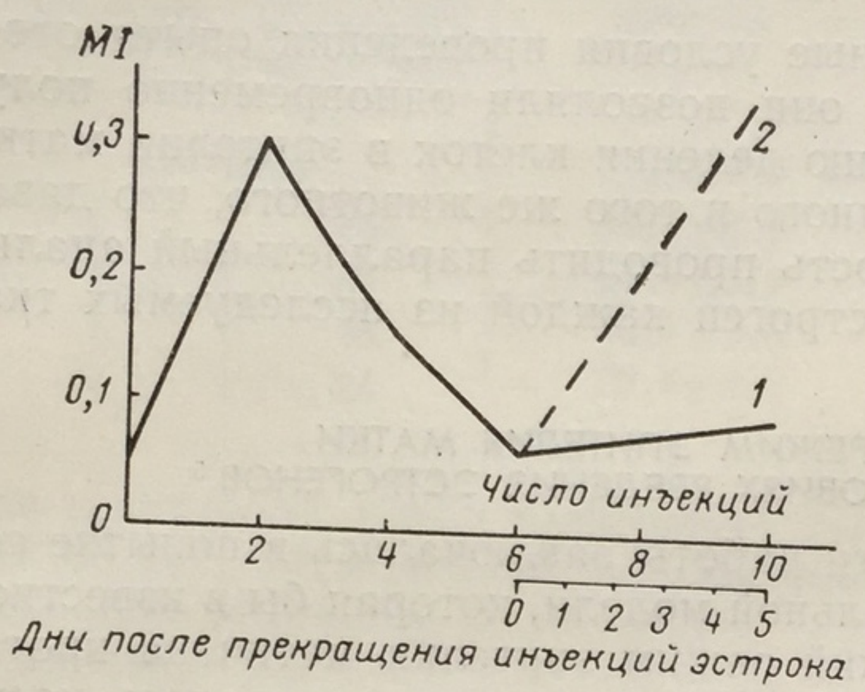


Рис. 24. Изменение митотического индекса в эпителии матки у мышей

1 — при введении эстрона; 2 — после прекращения введения эстрона

В опыт было взято 130 половозрелых самок весом 22—23 *г*. Все мыши были кастрированы и затем разбиты на семь групп по 8—10 животных в каждой. Мышам I—V групп начиная с 20-го дня после удаления яичников ежедневно вводили по 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла. Животные этих групп различались между собой по числу инъекций препарата (2, 4, 6, 8 и 10 инъекций); их забивали через 24 часа после последней инъекции. В VI группе введение эстрона было прекращено после шести инъекций и мыши были забиты через 5 дней после прекращения воздействия. Животные VII группы служили контролем; им вводили только масло и забивали по четыре на каждую подопытную группу. Эффективность действия эстрона контролировали взятием вагинальных мазков на протяжении всего опыта. Матку фиксировали в жидкостях Ценкера, Максимова и Карнуа. Поперечные срезы через рог толщиной 7 μ окрашивали гематоксилином по Караччи, а также по Фельгену и по Браше. Митотический индекс выражали числом митозов на единицу площади эпителия.

У кастрированных мышей в эпителии матки на всех сроках забоя встречаются лишь единичные митозы. В то же время уже после двух инъекций эстрона (рис. 24) число клеточных делений в этой ткани достигает значительной величины [$MI = 0{,}30 \pm 0{,}07$). Однако при дальнейшем увеличении числа инъекций митотический индекс снижается; после четырех инъекций $MI = 0{,}16 \pm \pm 0{,}03$, а после шести инъекций $MI = 0{,}05 \pm 0{,}001$; снижение количества митозов в интервале от двух до шести инъекций достоверно ($P = 0{,}01$). Низкий митотический индекс удерживается с

некоторыми колебаниями вплоть до окончания курса введения препарата: после восьми инъекций $MI = 0{,}06 \pm 0{,}02$, а после 10 инъекций — $0{,}08 \pm 0{,}01$. Прекращение введения эстрона после шести инъекций (VI группа) вызывает резкое увеличение числа клеточных делений ($MI = 0{,}38 \pm 0{,}06$; $P < 0{,}0001$).

Как было показано в разделе 2, при нормально протекающем эстральном цикле мыши в конце эструса начинается процесс деструкции эпителия матки, достигающий большого развития в метаэструсе; одновременно протекает регенерация эпителия с завершением его реконструкции в начале диэструса. На протяжении этого периода цикла содержание эстрогенов в крови животного уменьшается, но число митозов в эпителии матки непрерывно нарастает (см. рис. 20 и 21).

Вариант опыта, в котором введение эстрона мышам прекращали за 5 дней до забоя (VI группа), являлся, как уже говорилось, попыткой воспроизвести эту часть эстрального цикла. Оказалось, что снижение содержания эстрогена в крови у мышей само по себе приводит к значительному подъему митотической активности, который, по-видимому, как и в норме, связан с регенерацией и возвратом эпителия к исходному состоянию. Естественно, что во время обычного цикла, когда концентрация эстрогенов в крови снижается постепенно, изменения митотического индекса носят более ступенчатый характер.

Полученные результаты показывают, что эстрон способен стимулировать митотическую активность эпителия матки лишь после первых инъекций. Дальнейшее введение гормона приводит к уменьшению числа делящихся клеток в ткани. О снижении функциональной активности клеток эпителия матки мыши при продолжающихся инъекциях эстрогенов свидетельствуют и морфологические описания структур (Arias-Stella, 1955a, b), а также данные электронномикроскопических исследований (Nilsson, 1959a, b, c; 1962a, b; Nilsson a. Norberg, 1963; Nilsson a. Wirsén, 1963a, b; Fuxe a. Nilsson, 1963; Hökfelt a. Nilsson, 1963 (рис. 25)).

Таким образом, выбранные доза и сроки исследования действия эстрона на эпителий матки у мышей позволили уловить определенное сходство между наблюдаемыми в опыте изменениями митотической активности и теми сдвигами в митотическом режиме эпителия, которые имеют место на протяжении эстрального цикла.

Нарастание концентрации эстрогена в крови мышей после введения его извне приводило сначала, как и в проэструсе, к значительному повышению митотического индекса в эпителии матки. Дальнейшее увеличение числа инъекций гормона вызывало снижение митотического индекса, наблюдавшееся до тех пор, пока содержание эстрогена в крови оставалось высоким и ткани матки продолжали им насыщаться. С помощью меченного тритием эстрона было показано (Jacobson, 1962), что при

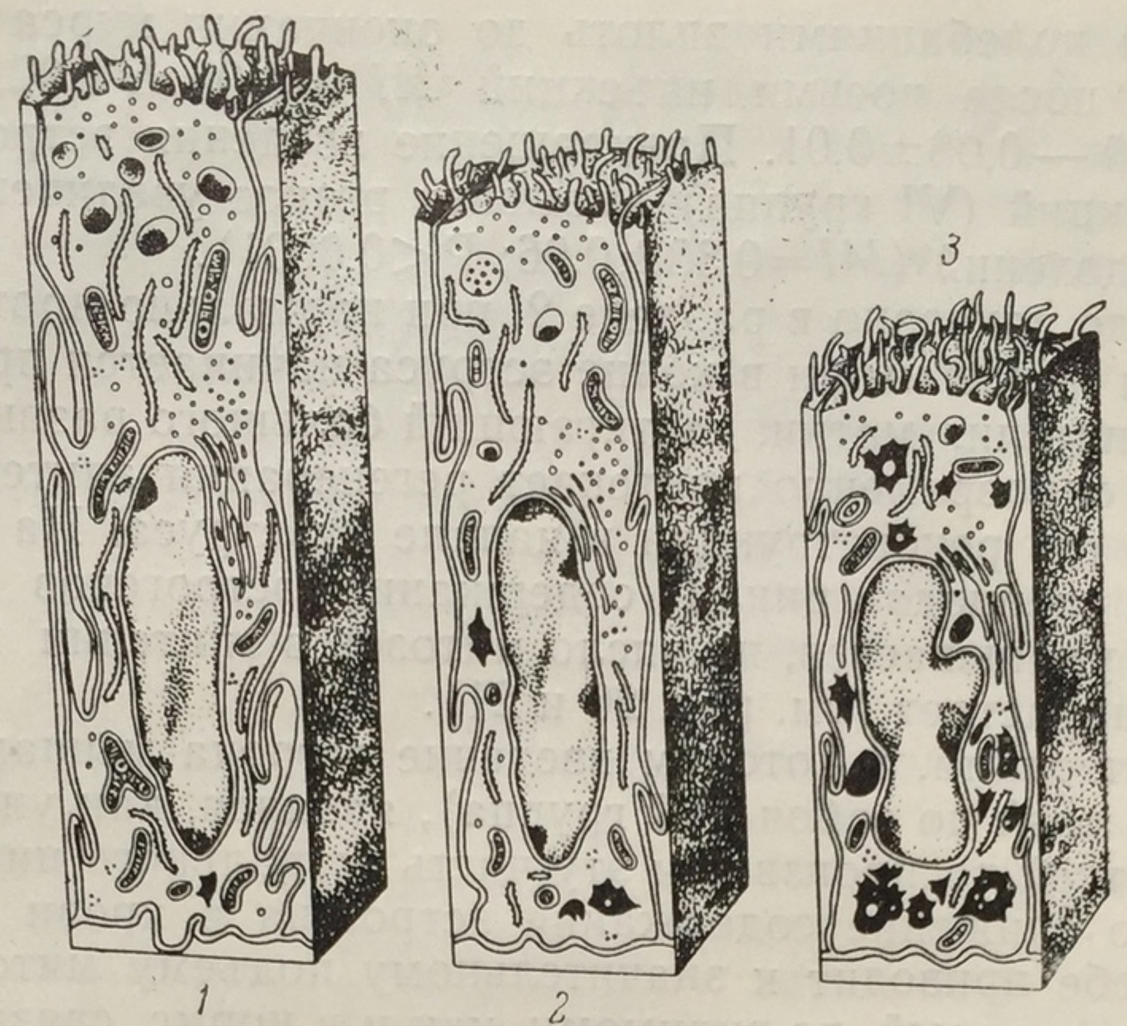


Рис. 25. Схема изменения клеток эпителия матки мыши под влиянием эстрогена (Nilsson, 1959c)
1 — эструс; *2* — однократная инъекция эстрогена (забой через несколько дней); *3* — повторные инъекции эстрогена

подкожном введении его крысам максимальное включение изотопа в ткани матки происходит уже через 30 мин. Снижение концентрации эстрогена в крови мышей после прекращения его введения вызывало новый подъем числа клеточных делений в эпителии матки, подобно тому, как это происходило при переходе к диэструсу.

Для подтверждения правомерности проводимой аналогии и дальнейшего изучения вопроса требовалось выяснить, не является ли торможение митотической активности в эпителии матки после шести инъекций эстрона следствием чрезмерно большой его концентрации в организме мыши, не встречающейся в обычных физиологических условиях и оказывающейся поэтому неблагоприятной для размножения клеток эпителия матки. С этой целью был поставлен второй опыт. В задачу его входило сравнение действия на митотическую активность эпителия матки большой и малой доз эстрона.

В опыт были взяты 24 мыши весом 20 *г* с предварительно удаленными яичниками, которых разбили на четыре группы по шесть животных в каждой. Мышам I и II групп вводили однократно по 15 γ эстрона в 0,1 *мл* масла; эта доза точно соответствовала 6 дозам эстрона по 2,5 γ, которые в первом опыте вызывали при ежедневном повторном введении торможение клеточного деления в эпителии матки у мышей. Эти группы опыта

различались между собой только по срокам забоя мышей. Мышам III группы вводили эстрон в дозе 1,5 γ, которая была в 10 раз меньше предыдущей. Животных I группы забивали через 12 час., а животных II и III групп — через 24 часа после инъекции. Эстрон вводили, как обычно, под кожу спины. IV — контрольную — группу составляли мыши, которым было введено по 0,1 *мл* масла.

Матку фиксировали в жидкости Карнуа и окрашивали гематоксилином Майера. Митотический индекс выражали числом митозов в промилле к общему числу клеток. Результаты опыта представлены в табл. 13.

Таблица 13

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей при действии разных доз эстрона

Доза эстрона, γ	Время между инъекцией и забоем, часы	Митотический индекс, ‰
Контроль	—	2,8±0,7
15	12	16,9±2,5
15	24	10,6±1,9
1,5	24	18,2±1,9

Как показывают данные таблицы, эстрон вызывает увеличение числа митозов в эпителии матки у мышей всех подопытных групп. Уже через 12 час. после введения 15 γ эстрона в эпителии наблюдается значительный подъем митотической активности по сравнению с контролем ($P<0,0001$). Спустя 24 часа после введения эстрона в той же дозе митотический индекс оказывается несколько ниже, чем через 12 час., однако это различие не является достоверным ($P=0,07$). В то же время наблюдаемое увеличение митотического индекса через 24 часа после введения 15 γ эстрона достоверно превышает число митозов у контрольных животных ($P=0,004$). Эстрон в дозе 1,5 γ вызывает, как и следовало ожидать, значительную стимуляцию клеточных делений в эпителии матки у мышей ($P<0,0001$). Наблюдаемое при этом увеличение митотического индекса выше, чем на том же сроке исследования у мышей после введения 15 γ эстрона ($P=0,017$), что не является удивительным, так как доза эстрона, равная 1,5 γ, более оптимальна для мыши (см. раздел 5 настоящей главы).

Таким образом, полученные результаты показывают, что однократная инъекция эстрона в дозе 15 γ стимулирует митотическую активность в эпителии матки через 12 и 24 часа после воздействия. При этом через 12 час. после инъекции мышам 15 γ эстрона наблюдается почти такое же увеличение митотического индекса, как и через 24 часа после инъекции 1,5 γ эстрона.

Следовательно, причиной торможения клеточного деления в эпителии матки, наблюдавшегося в первом опыте после шести последовательных инъекций мышам 2,5 γ эстрона, не могло служить абсолютное увеличение содержания гормона в организме

животного. В соответствии с данными, изложенными в гл. I и IV, напрашивалось предположение, что при повторном введении эстрона мышам начинает проявляться правило исходного состояния, согласно которому тот или иной фактор стимулирует функцию при ее пониженной напряженности и тормозит при повышенной (см. гл. I, раздел 2). Торможение митотической активности в эпителии матки у мышей, развивающееся в процессе насыщения организма эстрогеном, можно было рассматривать, как проявление действия механизмов авторегуляции в живой системе. Это подтверждалось тем, что прекращение инъекций гормона вызывало значительное повышение митотического индекса ткани; следовательно, клетки эпителия не утратили способности делиться. Таким образом, налицо была картина стабилизации процесса размножения клеток с последующим компенсаторным подъемом.

Проверить справедливость предположения о том, что наблюдаемые колебания числа митозов в эпителии матки в опыте с повторным введением эстрона носят регуляционный характер, можно было, построив схему эксперимента таким образом, чтобы прекращать инъекции на фоне различного уровня митотической активности ткани; с этой целью исследовали митотический режим эпителия матки при повторном введении эстрона и после прекращения инъекций в периоды максимальной и минимальной митотической активности ткани. Поскольку эти периоды уже были выявлены (см. рис. 24), в настоящем опыте можно было ограничиться более редкими сроками взятия материала. Это позволило подробнее исследовать митотический режим эпителия матки на разных сроках после кастрации животных.

В опыт было взято 80 половозрелых самок весом 20 *г*. Все животные были кастрированы за двадцать дней до начала опыта и затем разбиты на семь подопытных и четыре контрольные группы в среднем по восемь мышей в каждой подопытной и по шесть в каждой контрольной группах. Подопытным мышам I—III групп ежедневно вводили подкожно по 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла. Животные этих групп различались между собой по числу инъекций препарата (2, 6 и 10 инъекций). Мышам контрольных групп производили соответственно такое же число инъекций масла и забивали в разные сроки после кастрации (20, 22, 26 и 30 дней). В опыте животных забивали через 24 часа после последнего введения.

Мышам IV и V групп делали по две инъекции эстрона и забивали их соответственно на третий и пятый день после прекращения введения гормона; животных VI и VII групп забивали в те же сроки после прекращения введения эстрона, но после шести предварительных инъекций препарата.

Матку фиксировали в жидкости Ценкера. Окрашивание срезов производили гематоксилином по Караччи. Митотический индекс выражали числом митозов на единицу площади эпителия.

Результаты исследования действия на митотический режим эпителия матки повторных инъекций эстрона представлены на рис. 26. Как показывает график, число митозов в эпителии матки у кастрированных животных на всех сроках после удаления яичников невелико (митотические индексы равны соответственно 0,12±0,02; 0,11±0,02; 0,12±0,04; 0,06±0,01; различия между этими величинами не являются достоверными). После двух инъекций эстрона митотический индекс достигает значительной величины (MI=0,45±0,05; P=0,04), а после шести инъекций снижается до исходного уровня (MI=0,11±0,02; P=0,01) и остается низким до конца опыта (MI=0,08±0,01).

Эти результаты почти полностью воспроизводят кривую изменений митотического индекса в эпителии матки у мышей при повторном введении эстрона, полученную в первом опыте (см. рис. 24), подтверждая, таким образом, что период максимальной митотической активности в данных условиях наступает после двух, а минимальной после шести инъекций гормона.

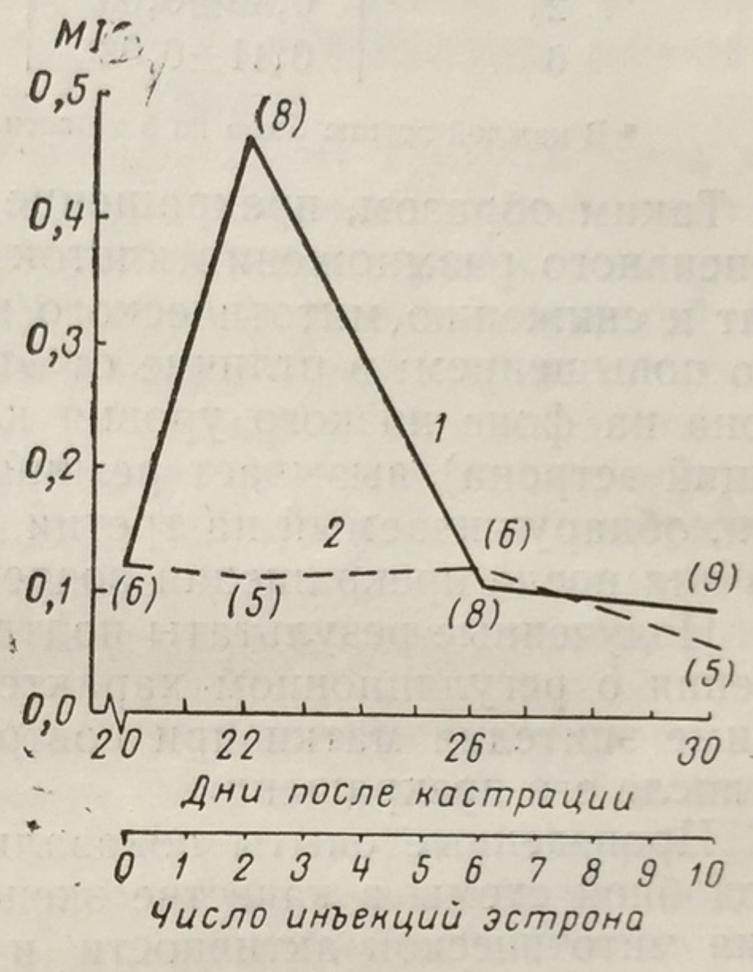


Рис. 26. Митотический индекс в эпителии матки у мышей на различных сроках после кастрации и введения 2,5 γ эстрона

1 — опыт, 2 — контроль. В скобках указано число животных

Далее предстояло исследовать митотический режим в эпителии матки на разных сроках после прекращения инъекций эстрона в указанные два периода. Результаты этой части опыта представлены в табл. 14.

Как следует из таблицы, в случае шести предварительных инъекций эстрона число митозов в эпителии матки значительно увеличивается не только на пятый день после прекращения введения препарата (P=0,002), но уже и через три дня (P<0,0001).

Совершенно иным образом отражается на митотическом режиме эпителия матки прекращение введения эстрона в период максимальной митотической активности ткани, то есть после двух инъекций.

Из таблицы можно видеть, что в этом случае на третий день после прекращения воздействия наблюдается снижение митотической активности в два с лишним раза (P=0,06), однако на пятый день после прекращения инъекций гормона митотический индекс вновь возрастает вдвое (P=0,05).

Таблица 14

*Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей после прекращения введения эстрона в периоды максимальной и минимальной митотической активности**

Число инъекций эстрона до прекращения воздействия	Митотический индекс (на ед. пл.)		
	до прекращения воздействия	после прекращения воздействия	
		на 3-й день	на 5-й день
2	0,45±0,05	0,21±0,04	0,40±0,07
6	0,11±0,02	0,39±0,05	0,40±0,05

* В каждой группе было по 8 животных.

Таким образом, прекращение введения эстрона в период интенсивного размножения клеток (две инъекции эстрона) приводит к снижению митотического индекса в ткани с последующим его повышением; в отличие от этого прекращение введения гормона на фоне низкого уровня клеточного деления (шесть инъекций эстрона) вызывает резкий подъем митотической активности, обнаруживаемый на третий день и сохраняющийся до пятого дня после прекращения воздействия.

Полученные результаты подтвердили правильность предположения о регуляционном характере сдвигов в митотическом режиме эпителия матки при повторном введении мышам эстрона и после его прекращения.

Проведенные опыты показали правомерность использования подобной схемы в качестве экспериментальной модели: изменения митотической активности и морфологические перестройки эндометрия в выбранных условиях воздействия в целом оказались почти такими же, как и на протяжении обычного эстрального цикла у мышей. Создавалось впечатление, что повышение концентрации эстрогенов в организме, вслед за первоначальной стимуляцией деления (проэструс или две инъекции эстрона) блокирует на каком-то этапе нормальное прохождение клетками эпителия матки периода подготовки к митозу, не вызывая вместе с тем необратимых функциональных нарушений в клетке. Следствием этого блока является снижение числа митозов в эпителии матки в эструсе или же после шести инъекций эстрона. Когда содержание эстрогенов в крови начинает падать (метаэструс — диэструс, а в опыте прекращение инъекций эстрона), блок снимается и клетки вступают в митоз в значительном количестве.

Возникал вопрос о причинах развивающегося торможения митотической активности. Прежде всего важно было выяснить, какие факторы участвуют в регуляции этого феномена и насколько глубоким оказывается наблюдаемое подавление клеточного деления. Некоторые данные, относящиеся к этому вопросу, содержатся в следующем разделе главы.

7. МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ В СОЧЕТАНИИ С НЕКОТОРЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ И СТИМУЛЯТОРАМИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК [6]

Общая задача состояла в том, чтобы исследовать действие веществ, способствующих стимуляции митотической активности в эпителии матки у мышей, на фоне повторных инъекций эстрона, и посмотреть, будет ли в этих условиях сохраняться наблюдаемый эффект. Тем самым предполагалось выяснить, не связано ли торможение клеточного деления с инактивацией или недостатком исследуемых веществ в организме.

Кроме эстрогенов, к числу специфических стимуляторов митотической активности в эпителии матки относят гормон желтого тела — прогестерон, вызывающий в эндометрии характерную прогестиновую пролиферацию в период, предшествующий беременности (см. раздел 4). Дальнейшим назначением прогестерона на протяжении беременности является десенсибилизация матки к факторам, обусловливающим сокращение миометрия. Кроме того, он угнетает лютеинизирующую функцию гипофиза и тем самым препятствует наступлению овуляции во время беременности (см. раздел 2) и выполняет ряд других важных функций.

Как уже говорилось, своевременное наступление всех стадий эстрального цикла и беременности обеспечивается согласованным взаимодействием гормонов яичника и гипофиза (см. рис. 19). В силу множественного характера связей, возникающих в данной цепи регулирования, эстрогены и прогестерон, влияя на разные процессы, могут выступать как синэргисты или же как антагонисты. Так, например, прогестерон препятствует ороговению эпителия влагалища у грызунов, вызываемому эстрогенами (см. раздел 1 настоящей главы), и приводит к появлению слизи в вагинальном мазке (феномен муцификации), что позволяет тестировать его эффективность. В то же время для воспроизведения в эксперименте прегравидарных изменений матки, то есть для получения прогестиновой пролиферации эндометрия, необходимо предварительное насыщение организма эстрогеном; в противном случае действие прогестерона не проявляется (см. Кабак, 1945; Эскин, 1951; F. Hisaw a. F. Hisaw, 1961, и др.).

Однако Ллойд (Lloyd) еще в 1937 г. сообщил, что в опытах на кастрированных кроликах ему удалось получить почти пятидесятикратное увеличение числа митозов в эпителии матки после трехдневного введения физиологических доз прогестерона. Следует отметить, что прогестиновая пролиферация эпителия особенно отчетливо выражена у кроликов, и большинство работ по изучению действия гормона желтого тела на матку выполнено

[6] См. Епифанова, 1959 г.; 1961а, б, в.

именно на этом объекте. По данным Хаскинса и Леонга (Haskins a. Leong, 1958), однократное введение неполовозрелым кроликам 6, 12 и 25 *мг* прогестерона после шести предварительных инъекций эстрогена также вызывало после 36-часового латентного периода значительное увеличение митотического индекса в эпителии матки; наибольшее число клеточных делений наблюдалось через 48 час. после введения прогестерона, а через 96 час. оно снижалось до исходного уровня. Таким образом, эти данные показывают, что прогестерон способен стимулировать митотическую активность в эпителии матки кроликов как после кастрации, так и на фоне предварительного введения эстрогенов. Работы на мышах в этом плане не проводились.

В качестве неспецифического стимулятора клеточного деления была выбрана аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), занимающая центральное место среди макроэргических фосфорных соединений. Изучение роли АТФ в регуляции деления клеток привлекло внимание исследователей после того, как на дробящихся яйцах морских ежей было показано, что она снимает угнетающее действие на митоз аноксии и гипоксии, пониженной температуры и высокого гидростатического давления. В последние годы интерес к этому вопросу снова возрос, так как в митотическом аппарате морского ежа была обнаружена типичная АТФ-аза (Mazia et al., 1961; Miki, 1963; подробнее см. гл. I). Значение АТФ для протекания нормального митоза одно время оспаривалось даже в отношении яиц морских ежей (Swann, 1953, 1954b), однако недавно с помощью точных измерений на том же объекте удалось получить прямую корреляцию между числом митозов, синтезом и утилизацией АТФ (Epel, 1963).

Способность АТФ оказывать стимулирующее действие на деление клеток при введении в организм млекопитающих была продемонстрирована на примере эпителия роговицы (Уткин, 1958) и эпителия влагалища (Sergi, 1960). По данным Уткина, АТФ (0,2 *мл* 1%-ного раствора) вызывает у мышей через 2 часа после однократной подкожной инъекции увеличение числа клеточных делений в эпителии роговицы с последующим снижением до обычного уровня через 4—24 часа.

Наконец, решено было исследовать в выбранных условиях опыта действие фолиевой (птероилглутаминовой) кислоты — одного из метаболитов синтеза ДНК. Фолиевая кислота, превращаясь в клетке в биологически активный фактор цитроворум — тетрагидрофолиевую кислоту, выполняет важную функцию переноса одноуглеродных фрагментов при синтезе пуринов, тимина, метионина и других метаболитов (см. Белоусова, 1963).

Известно, что фолиевая кислота сама по себе неспособна стимулировать пролиферативные процессы (Peňhos, 1955, 1956; Peňhos y Cardeza, 1957; Härkönen a. Kiviranta, 1958), однако ее присутствие необходимо для проявления стимулирующего дей-

ствия эстрогенов на органы-мишени (см. Timmis, 1961, и др.). В опытах Гелфанта, Мейера и Риса (Gelfant, Meyer a. Ris, 1955) выключение функции фолиевой кислоты введением ее аналога — аминоптерина препятствовало проявлению стимулирующего действия эстрогена на деление клеток в эпителии и других тканях матки крыс. В условиях одновременного введения эстрогена, аминоптерина и фолиевой кислоты увеличение числа митозов матки было даже более значительным, чем при введении одного эстрогена. В то же время введение крысам с удаленными яичниками только фактора цитроворум без сочетания с эстрогеном вызывало лишь незначительное повышение митотической активности в эпителии по сравнению с контролем. Эти свойства фолиевой кислоты обусловили ее выбор для изучения феномена тормозящего действия повторных инъекций эстрона на деление клеток в эпителии матки у мышей.

Всего в этой части исследований было проведено два опыта: в первом опыте изучали действие эстрона и прогестерона, во втором опыте — действие эстрона в сочетании с АТФ и фолиевой кислотой.

В первый опыт было взято 45 кастрированных самок весом 20 *г*. Шесть мышей было оставлено в качестве контроля, а остальных разбили на четыре группы. Мышам I и II групп сделали соответственно по шести и по 10 инъекций эстрона (животным I группы после эстрона вводили масло). В III группе после шести инъекций эстрона животным в течение пяти дней ежедневно вводили по 0,2 *мг* продажного препарата прогестерона (Δ^4-прегнен-3,20-диона) в 0,1 *мл* масла; указанная доза и способ введения обеспечивают быстрое всасывание гормона, уровень которого в крови у мышей значительно возрастает уже через несколько часов. Мышам IV группы прогестерон вводили также в течение пяти дней, но без предварительной обработки эстроном (после шести ежедневных инъекций масла).

Контрольные животные получали только масло. Забой производили через 24 часа после последней инъекции. Эффективность действия препаратов контролировали ежедневно взятием вагинальных мазков.

Матку фиксировали в жидкости Ценкера. Поперечные срезы через рог окрашивали гематоксилином по Караччи. Митотический индекс выражали числом митозов на единицу площади эпителия. Результаты опыта представлены в табл. 15.

Как следует из данных таблицы, введение прогестерона кастрированным животным вызывает значительную стимуляцию деления клеток в эпителии матки ($P<0,0001$). В то же время при действии прогестерона в течение пяти дней после предварительной обработки животных эстроном митотический индекс оказывается практически таким же, как после шести и 10 инъекций эстрона.

Таблица 15

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей при введении эстрона и прогестерона

Воздействие	Число животных	Число инъекций	Митотический индекс (на ед. пл.)
Контроль	6	—	0,08±0,02
Эстрон	8	6	0,05±0,001
Эстрон	10	10	0,08±0,01
Прогестерон	9	5	0,36±0,11
Прогестерон после шести инъекций эстрона	10	5	0,08±0,02

Таким образом, было показано, что пять ежедневных инъекций кастрированным мышам 0,2 *мг* прогестерона вызывают почти такое же значительное увеличение митотической активности в эпителии матки, как и две инъекции 2,5 γ эстрона (см. рис. 24 и 26). Однако в условиях предварительного введения эстрона митотический индекс ткани, подвергнутой 5-дневному воздействию прогестерона, оказывается низким, хотя, как уже говорилось, предварительное насыщение эстрогеном считается необходимым условием получения прогестиновой пролиферации в эксперименте. Можно предположить, что подъем митотической активности имел место и в наших опытах, но на более ранних сроках введения прогестерона и поэтому не был уловлен.

Это предположение согласуется с данными Хаскинса и Леонга (Haskins a. Leong, 1958), которые наблюдали наибольшее увеличение числа митозов в эпителии матки кролика через 48 час. после введения прогестерона (вслед за шестью предварительными инъекциями эстрона), в то время как максимальная степень прогестиновой пролиферации отмечалась ими через 72—96 час., когда митотический индекс уже снижался. Этим можно объяснить тот факт, что в наших опытах при хорошо выраженной прогестиновой пролиферации эпителия матки мыши через пять дней после ежедневных инъекций прогестерона на фоне предварительного насыщения эстроном митотический индекс оказался низким.

С другой стороны, прогестиновой пролиферации эпителия матки на ранних сроках беременности у мышей вообще не предшествовало увеличение митотического индекса (см. раздел 4 настоящей главы). Это позволяет сделать и другое допущение: что в условиях высокого содержания эстрогенов в организме прогестерон может выступать на каком-то этапе как их анта-

гонист и не способствовать повышению числа делящихся клеток в эпителии матки там, где это биологически нецелесообразно, например во время беременности, когда эпителий должен резорбироваться. На это указывает тот факт, что без предварительного насыщения эстроном прогестерон способен значительно стимулировать митотическую активность эпителия матки мыши. Отчетливо выраженных морфологических изменений в эндометрии в выбранных условиях опыта не наблюдалось. По-видимому, для этого нужно более длительное время. Имеются данные (Willemse a. Paesi, 1958) об увеличении размеров клеток и изменении формы ядер эпителия матки кастрированных крыс через две недели после ежедневного введения 0,15 *мг* прогестерона без предварительной обработки эстрогеном.

Полученные результаты привели к заключению, что прогестерон, как и эстрогены, является специфическим стимулятором деления клеток в эпителии матки, обладающим своими характерными особенностями действия. Важно, однако, что эти особенности не дают никаких оснований связывать эффект торможения митотической активности в эпителии матки при повторном введении эстрона с отсутствием в организме кастрированных мышей прогестерона, поскольку одинаково низкий митотический индекс наблюдался как после шести и одиннадцати инъекций эстрона, так и после пяти инъекций прогестерона на фоне шести предварительных инъекций эстрона.

Таким образом, данные опытов с экзогенным введением мышам прогестерона, в совокупности с результатами опытов по естественной активации желтых тел на ранних сроках беременности, позволяли сделать вывод, что хотя прогестерон и способен стимулировать деление клеток в эпителии матки, он, по-видимому, не принимает участия в регуляции митотического режима эпителия матки на протяжении обычного эстрального цикла и его стимуляционные свойства проявляются при других обстоятельствах, возможно в отсутствие эстрогенов.

Во втором опыте изучали действие эстрона в сочетании с АТФ и фолиевой кислотой. Под опытом находилось 50 мышей весом 20 *г*, которым через 20 дней после кастрации было сделано по шесть инъекций 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла, после чего мыши были разбиты на шесть групп. Животным I группы в течение четырех дней вводили масло и физиологический раствор, животным II группы сделали четыре ежедневные инъекции эстрона и столько же инъекций физиологического раствора; в III группе мышам одновременно с эстроном вводили в течение четырех дней под кожу по 0,2 *мл* 0,03%-ного раствора фолиевой кислоты, а в IV группе в аналогичных условиях — эстрон и 0,2 *мл* 1%-ного раствора кристаллической АТФ (растворы готовили непосредственно перед опытом); животным V и VI групп в те же сроки сделали соответственно по четыре инъекции фолиевой кислоты

или АТФ и одновременно вводили масло. В предварительных опытах на кастрированных мышах было показано, что АТФ стимулирует митотическую активность эпителия матки; при этом увеличение числа митозов было более значительным при введении АТФ за 2, а не за 24 часа до забоя, но эти различия не являлись достоверными, и поэтому всех животных забивали, как обычно, через 24 часа после последнего воздействия. Результаты опыта представлены в табл. 16.

Таблица 16

Средний митотический индекс в эпителии матки у мышей при введении фолиевой кислоты и АТФ после шести предварительных инъекций эстрона

Воздействие (4 инъекции)	Число животных	Митотический индекс (на ед. пл.)
Эстрон	10	0,08±0,01
Прекращение инъекций эстрона	8	0,40±0,07
Эстрон и фолиевая кислота	8	0,08±0,01
Фолиевая кислота	7	0,51±0,05
Эстрон и АТФ	10	0,05±0,01
АТФ	7	0,42±0,07

Как следует из данных таблицы, при продолжающихся инъекциях эстрона ни фолиевая кислота, ни АТФ не стимулируют клеточного деления. Если же вводить препараты АТФ и фолиевой кислоты после шести предварительных инъекций эстрона, без дальнейшего применения последнего, то наблюдается значительный подъем митотической активности (P соответственно $<0,0001$), не превышающий, однако, интенсивности деления клеток в те же сроки после прекращения введения гормона. Отсюда следует, что этот подъем связан не с введением фолиевой кислоты или АТФ, а только с прекращением инъекций эстрона.

Таким образом, в условиях проведенного опыта ни фолиевая кислота, ни АТФ не могли повысить уровень клеточного деления при продолжающихся инъекциях эстрона, в то время как прекращение его введения вызывало резкий подъем митотической активности ($P<0,0001$).

Материал, изложенный в настоящем разделе, явился достаточно однозначным по своим результатам, так как дополнительными воздействиями ни в одном из опытов не удалось снять тормозящего влияния повторных инъекций эстрона на деление клеток в эпителии матки, в то время как прекращение введения гормона и само по себе, и в сочетании с другими воздействиями вызывало подъем числа митозов. Эти опыты свидетельствовали о большой стойкости феномена торможения.

Поскольку полученные данные не давали оснований связать наблюдаемые сдвиги митотической активности в эпителии матки на протяжении эстрального цикла и в условиях его экспериментального воспроизведения при повторном введении эстрогенов ни с одним из испытанных соединений (прогестерон, фолиевая кислота, АТФ), вопрос о факторах, участвующих в регуляции подъемов и спадов числа митозов в эпителии матки, оставался нерешенным.

Прежде чем подвергать этот предмет дальнейшему исследованию, необходимо было получить предварительные сведения об изменениях продолжительности митоза и интерфазы в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей. Эти данные были необходимы для установления точек приложения действия эстрона в митотическом цикле обеих тканей, что позволило бы подойти к выяснению причин различного влияния гормона на митотический режим эпителия матки и эпителия роговицы.

8. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ МИТОЗА И ИНТЕРКИНЕЗА В ЭПИТЕЛИИ МАТКИ И ЭПИТЕЛИИ РОГОВИЦЫ [7]

Методы изучения продолжительности митоза и интеркинеза. В процессе изучения закономерностей митотического деления клеток исследователи уже давно столкнулись с необходимостью получения сведений о времени протекания митоза. Естественно, что наиболее точным методом определения продолжительности митоза является прижизненное наблюдение (см. St. Amand et al., 1960), однако оно осуществимо далеко не во всех случаях. Поэтому постепенно были разработаны различные косвенные методы, позволяющие с большей или меньшей точностью устанавливать продолжительность митоза в тканях.

Для определения длительности митоза могут служить различные методические приемы, вызывающие сдвиги в числе делящихся клеток за небольшой, точно регистрируемый промежуток времени. Это легко достигается с помощью малых доз рентгенооблучения (Стрелин, 1935; Knowlton a. Widner, 1950; Widner et al., 1951; Бочков, 1960а; Мовчан, 1964, и др.), митостатических веществ (Ludford, 1936; Buschke et al., 1943; Leblond a. Stevens, 1948; Stevens, 1948; Stevens a. Leblond, 1953; McMinn, 1954; Stevens Hooper, 1961, и др.), охлаждения (Гурвич и Гурвич, 1945) и других факторов. Общие принципы такого определения подробно освещены в диссертации Уткина (1958).

Наиболее распространенными способами воздействия являются тотальное облучение животных и введение колхицина или колхициноподобных веществ (статмокинетический метод).

[7] См. Епифанова, 1962а; Епифанова и др., 1963.

Первый метод основан на том, что рентгеновское облучение, как и другие виды ионизирующей радиации, вызывает в тканях быстро возникающее и глубокое подавление митотической активности, связанное с торможением вступления клеток в митоз. При этом скорость деления клеток практически не меняется (Уткин, 1958). Следовательно, определяя время исчезновения всех митозов или же время распространения волны торможения с ранних фаз деления на поздние, можно вычислить продолжительность митоза.

Второй метод основывается на свойстве колхицина останавливать деление клеток на стадии метафазы и вызывать таким образом накопление митозов. Число остановленных колхицином митозов ($MI_{кх}$) тем больше, чем выше митотический индекс ткани (MI), чем больше время действия колхицина (A) и чем быстрее протекает митоз ($t_м$).

Иными словами,

$$MI_{кх} = \frac{MIA}{t_м}, \tag{1}$$

откуда

$$t_м = \frac{MIA}{MI_{кх}}. \tag{2}$$

Колхициновый метод обладает рядом недостатков (Уткин, 1953в, 1958, 1959, и др.): прежде всего колхицин токсичен для организма, и, кроме того, он снижает число вступающих в деление клеток (W. S. Bullough, 1959; Hell a. Cox, 1963; Love, 1964, и др.); во многих случаях колхицин не вызывает также стопроцентной остановки метафаз. В силу этих причин число задерживаемых им митозов не нарастает строго пропорционально времени его действия и оказывается заниженным. Поэтому средняя продолжительность митоза, а следовательно, и вычисляемое время всего митотического цикла обычно бывают несколько завышенными. Учитывая это обстоятельство, исследователи рекомендуют метод облучения как предпочтительный (см. Уткин, 1958; Бочков, 1960а).

Однако этот вопрос, по-видимому, не всегда может быть решен однозначно. Сравнительное изучение продолжительности митоза в тканях мышей с помощью колхицина и тотального облучения животных в дозе 400 *р* (Епифанова и др., 1963) показало, что выбор способа определения длительности митоза в каждом случае должен быть продиктован спецификой и состоянием самой ткани.

Так, например, для тканей с относительно высоким уровнем митотической активности (эпителий роговицы, эпителий кишечника), где можно проследить за волной смещения митозов по фазам и уловить начало снижения их числа, более точные ре-

зультаты дает метод облучения. Если же уровень митотической активности ткани низок (как, например, в эпителии матки после кастрации), то целесообразнее судить о продолжительности митоза не по падению, а по накоплению числа делящихся клеток, то есть применяя колхициновый метод. Колхициновый метод удобен также в тех случаях, когда возникает необходимость сравнить длительность митоза в норме и при каком-либо воздействии; в условиях короткой экспозиции (4—6 час.) токсичностью колхицина можно пренебречь. В настоящее время колхициновый метод широко применяется в целях изучения продолжительности митоза и кинетики клеточных популяций в тканях животных (Evensen, 1962a и b, 1963; Evensen a. Iversen, 1962; Бочков и Косиченко, 1963; Elgjo, 1963), в растительных меристемах (Vant't Hof, G. B. Wilson a. Colon, 1960) и в культуре клеток (E. W. Taylor, 1963в, 1965; Терских, 1964, и др.).

Зная время митоза и общее количество клеток в ткани, можно рассчитать время интеркинеза. Известно, что отношение числа митозов (n) к числу неделящихся клеток (N) равно отношению длительности митоза ($t_м$) к длительности интеркинеза (T), то есть

$$\frac{n}{N} = \frac{t_м}{T}. \qquad (3)$$

Эта пропорция вытекает из статистической закономерности, согласно которой вероятность обнаружения какого-либо явления в определенном состоянии прямо пропорциональна времени нахождения его в этом состоянии (см. Naville, 1936; Гурвич и Гурвич, 1945; Уткин, 1958). Отсюда

$$T = \frac{t_м N}{n}. \qquad (4)$$

Излагаемые ниже опыты были поставлены для определения с помощью колхицинового метода продолжительности митоза и интеркинеза в эпителии матки и эпителии роговицы у кастрированных мышей и изменения этих параметров при действии эстрогена.

Продолжительность митоза и интеркинеза в эпителии роговицы мыши в обычных условиях была детально изучена Уткиным (1958, и др.). Применив колхициновый метод, он получил для половозрелых самцов величины $t_м = 75 \pm 5$ мин. и $T = 117 \pm \pm 8$ час. Это совпадало с данными Фриденвальда (Friedenwald, 1950), полученными тем же методом на эпителии роговицы крыс ($t_м = 70$ мин.). Однако обе найденные величины Уткин считает завышенными, поскольку в других опытах с применением двух различных методов определения продолжительности митоза и

интеркинеза в эпителии роговицы мыши (рентгенооблучение и физиологические воздействия) им были получены значительно меньшие и в то же время близкие между собой значения ($t_м$ = =47±2 и 46±2 мин.; соответственно T=78±4 и 76±4 часа). Данных об изменении этих величин под влиянием эстрогенов не имеется. Точно так же отсутствуют сведения о продолжительности митоза и интеркинеза в эпителии матки.

Под опытом было 24 мыши весом 18—20 *г*, кастрированные за 20 дней до начала эксперимента. Половине животных (I и II группы) сделали двукратную подкожную инъекцию 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла с интервалом в сутки; другой половине (III и IV группы) в аналогичных условиях вводили масло. Через 24 часа после второй инъекции (в 9 час. утра) мышам I и III групп ввели подкожно колхицин, растворенный в дистиллированной воде, в дозе 0,2 *мл* раствора 1 : 5000 (что соответствует 40 γ на мышь) с последующим забоем животных в 15 час. Животных II и IV групп забивали в интервале от 9 до 15 час. по одному через равные промежутки времени для усреднения суточных колебаний числа митозов.

Матку и роговицу фиксировали в жидкости Карнуа и окрашивали гематоксилином Майера. Митотический индекс выражали в промилле к общему числу клеток. Полученные данные представлены в табл. 17 и 18.

Таблица 17

Средняя продолжительность митоза и интеркинеза в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей до и после воздействия эстроном (колхициновый метод)

Исследованная ткань	Воздействие	MI, ‰	$MI_{кх}$, ‰	$t_м$, мин.	T, часы
Эпителий матки	—	1,7±0,6	13,1±1,1	46,7±7,1	452,0±145,0
	Эстрон	13,1±1,3	82,1±15,6	57,4±9,8	68,0±12,1
Эпителий роговицы	—	4,8±0,3	21,5±2,5	80,0±10,6	296,0±16,0
	Эстрон	7,2±0,7	33,2±8,8	78,0±8,8	181,0±14,5

Как следует из табл. 17, митотический индекс в эпителии матки возрастает через 6 час. после введения колхицина в 7,4 раза (P=0,005). При этом поздние фазы деления отсутствуют (см. табл. 18), что свидетельствует о полной остановке всех митозов на стадии метафазы и, следовательно, о пригодности данного метода для последующих определений.

Следует заметить, что величина T, вычисленная указанным способом, отражает лишь среднее время интеркинеза для клеточной популяции в целом. Как правило, клеточная популяция бывает гетерогенна (см. гл. IV), то есть не все ее клетки могут

Таблица 18

Соотношение фаз митоза в эпителии матки и эпителии роговицы мыши через 6 час. после введения колхицина

Исследованная ткань	Число митозов	Фазы митоза								Количество поздних фаз %
		профаза		метафаза		анафаза		телофаза		
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Эпителий матки	115	5	4,35	110	95,65	—	—	—	—	—
Эпителий роговицы	1607	65	4,05	1524	94,84	4	0,25	14	0,86	1,11

проходить митотический цикл и делиться. Поэтому для установления истинной продолжительности интеркинетического периода ткани необходимо точно знать процент клеток, способных к делению; в противном случае величина T всегда будет завышена. Однако в условиях данного опыта это не являлось обязательным, так как основная задача заключалась в сопоставлении действия эстрона на продолжительность митоза и интеркинеза каждой из исследуемых тканей, а не в установлении абсолютного значения величины T. Митотический индекс в эпителии роговицы возрастает через 6 час. после введения колхицина более чем в четыре раза ($P=0{,}001$). Как уже говорилось, Уткин, применяя колхициновый метод, получил для эпителия роговицы мыши $t_м = 75 \pm 5$ мин. и $T = 117 \pm 8$ час. Возможно, что большая продолжительность интеркинеза в данном опыте связана с кастрацией животных. Кроме того, в эпителии роговицы не наблюдалось стопроцентной остановки метафаз (табл. 18), что могло способствовать завышению величины $t_м$, а следовательно, и величины T, вычисленной по уравнению (4).

Для точного определения продолжительности митоза и интеркинеза в эпителии роговицы метод облучения, несомненно, предпочтительнее колхицинового (Епифанова и др., 1963), однако в условиях данного опыта важно было лишь уловить сдвиги в соотношении этих величин при действии эстрона.

Данные табл. 17 показывают, что эстрон вызывает увеличение числа митозов в обеих исследуемых тканях: в эпителии матки наблюдается увеличение в семь с лишним раз ($P < 0{,}0001$), а в эпителии роговицы — в полтора раза ($P=0{,}02$). Эти же отношения иллюстрирует рис. 27.

На рис. 28 схематически изображены изменения в протекании митотических циклов эпителия матки и роговицы у мышей по данным табл. 17: прерывистой линией показана относительная продолжительность интерфазы до введения гормона, сплошной —

после двух инъекций эстрона. Как видно из рисунка, время самого митоза ни в той, ни в другой ткани после введения гормона существенно не меняется; в обоих случаях его действие направлено на интерфазу. При этом продолжительность интерфазы

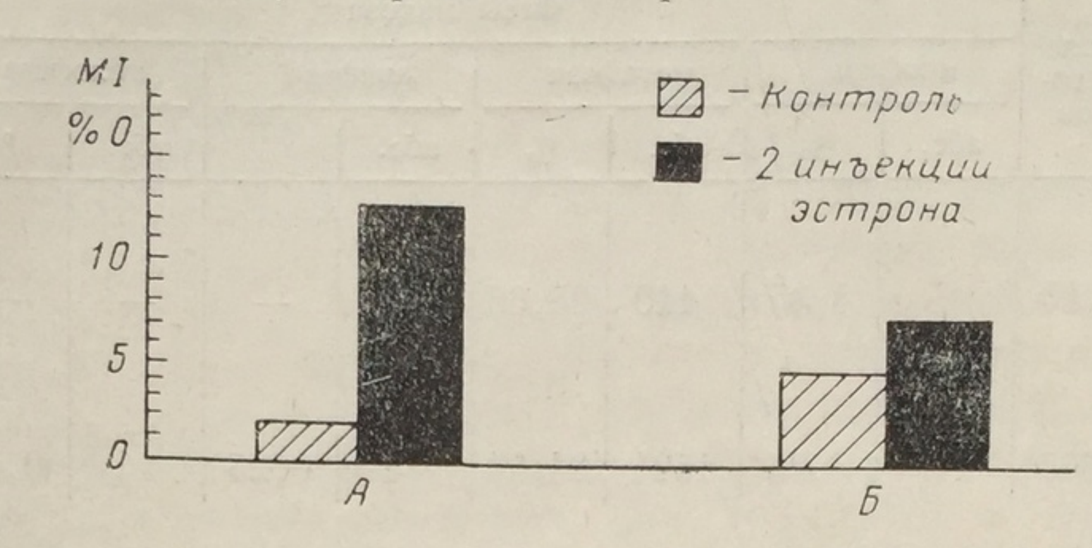


Рис. 27. Действие эстрона на митотический индекс эпителия матки (*А*) и эпителия роговицы (*Б*) у мышей

уменьшается в эпителии роговицы в 1,5 раза, а в эпителии матки — почти в 7 раз, то есть в той же степени, в какой под влиянием эстрона в эпителии матки и эпителии роговицы возрастает количество митозов.

Таким образом, и в эпителии матки, и в эпителии роговицы продолжительность митоза при действии эстрогена оставалась без изменений, а время интерфазы сокращалось пропорционально увеличению митотического индекса. Значительная разница в ответе на гормон позволяла думать, что наблюдаемая стимуляция деления клеток в исследуемых тканях связана с изменением различных отрезков их интерфаз, то есть с неоднозначными по своей природе процессами. Если бы это было так, то результаты проведенных опытов в значительной мере подтверждали бы представления Суонна (Swann, 1958; см. гл. IV), который предполагал существование различных путей гормональной регуляции деления клеток в тканях-мишенях и тканях, не обладающих специфичностью по отношению к гормону.

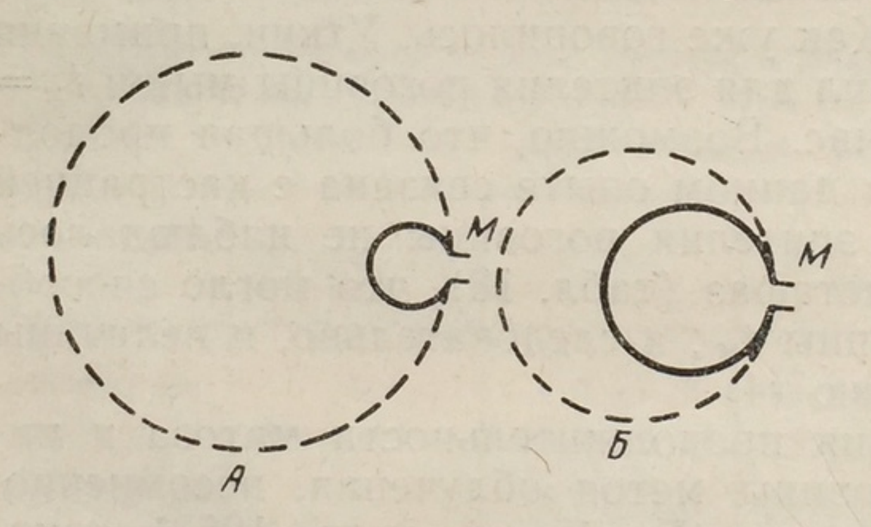


Рис. 28. Схема действия эстрона на митотический цикл эпителия матки (*А*) и эпителия роговицы (*Б*) у мышей

М — митоз. Прерывистая линия — продолжительность интерфазы до введения эстрона; сплошная линия — то же после двух инъекций 2,5 γ эстрона

Однако полученный материал не давал определенного ответа на поставленный вопрос, так как не было известно, на какие периоды интерфазы действует эстрон в митотическом цикле каждой из исследуемых тканей. С целью дальнейшего изучения вопроса были предприняты опыты по выяснению влияния эстрона на деление клеток в эпителии матки и эпителии роговицы в условиях инкубации.

9. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В ЭПИТЕЛИИ МАТКИ И ЭПИТЕЛИИ РОГОВИЦЫ В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ[8]

В опытах с инкубацией эпидермиса уха мыши Буллоу (W. S. Bullough, 1953, 1955b, и др.) показал, что при добавлении в среду эстрогенов они стимулируют митотическую активность ткани только в присутствии глюкозы, являющейся, как он предполагал, основным энергетическим источником деления клеток (подробно см. гл. IV). Отсюда был сделан вывод об активации эстрогенами глюкокиназной реакции и усилении притока энергии в «антефазе», то есть непосредственно перед вступлением клеток в митоз. Именно этот принцип действия эстрогенов Буллоу положил в основу своих представлений об их участии в регуляции деления клеток.

Как известно, взгляды Буллоу подверглись критике со стороны Гелфанта (Gelfant, 1960a, b, c, и др.), не обнаружившего в большой серии опытов связи между утилизацией глюкозы и характером действия гормонов на деление клеток в эпидермисе уха мыши in vitro. Гелфант пришел к заключению, что в основе стимуляции или торможения митозов при добавлении гормонов в инкубационную среду лежат иные механизмы, чем те, по которым осуществляется гормональная регуляция деления клеток в организме. Позднее было показано (Callard, 1963), что эстрон не стимулирует в условиях инкубации митотическую активность эпидермиса уха крыс. Тем самым был поставлен вопрос о границах применения метода инкубации органов по Буллоу для установления общих закономерностей участия гормонов в регуляции митотического деления.

В задачу исследования входило изучение в условиях инкубации действия эстрона на деление клеток в эпителии матки и эпителии роговицы — тканях, обладающих различной реакцией на данный гормон in vivo. В случае справедливости предположения Буллоу об универсальном характере действия эстрогенов как энергетических стимуляторов митоза можно было ожидать, что обе ткани — и ткань-мишень, и контрольная ткань — при кратковременной инкубации с эстроном будут реагировать на гормон увеличением числа митозов.

[8] См. Епифанова, Курская и Валеева, 1963.

При проведении опытов использовались в основном методы Буллоу и Джонсон (1951b) и Уткина (1961, 1962).

Подопытными животными служили беспородные белые мыши и мыши линии CBA. Всего было проведено 15 опытов на 83 мышах. Для каждого опыта брали по пять-шесть неполовозрелых или кастрированных за 20 дней до забоя самок. После забоя у мышей удаляли оба глаза и средние участки обоих рогов матки, которые помещали в четыре сосудика аппарата Варбурга таким образом, что два сосудика содержали по пять или шесть глаз, а два — по пять или шесть кусочков рогов матки. Среда инкубации представляла собой солевую буферную смесь следующего состава: 0,9% NaCl — 100 *мл*; 1,15% KCl — 4 *мл*; 1,22% $CaCl_2$ — 3 *мл*; 3,82% $MgSO_4$ $7H_2O$ — 1 *мл*; 0,1 *M* Na_2HPO_4 (pH 7,3) — 21 *мл*. К среде добавляли глюкозу до конечной концентрации 0,02 *M*.

Инкубацию проводили в 3 *мл* среды в атмосфере кислорода (при этом достигалась наилучшая сохранность тканей матки) при температуре 37° в течение 5 час. Через 1 час после начала инкубации в основное пространство сосудика вводили из боковой реторты колцемид в конечном разведении 1 : 250 000 для остановки вновь возникающих митозов на стадии метафазы. В сосудики с подопытным материалом (левые глаза или участки левого рога матки) добавляли 0,05 *мл* спиртового раствора, содержавшего 5 γ эстрона; в сосудики с контрольным материалом (правые глаза или участки правого рога матки) добавляли соответствующее количество спирта. В некоторых опытах использовали так называемый водный раствор эстрона (по Буллоу). С этой целью кристаллический эстрон растворяли в возможно меньшем количестве этилового спирта и затем добавляли физиологический раствор до тех пор, пока эстрон не начинал выпадать в осадок; 0,1 *мл* этого раствора, содержавшего 10 γ эстрона, вводили в среду для инкубации. К контрольной среде добавляли равный объем этанола.

По окончании инкубации материал фиксировали в жидкости Карнуа. Из роговиц готовили, как обычно, тотальные препараты, из рогов матки — поперечные срезы толщиной 7 μ; окраску препаратов производили гематоксилином Майера. Митозы подсчитывали в 4—5 тыс. клеток эпителия роговицы и эпителия полости матки. Митотический индекс выражали отношением числа митозов к общему числу клеток в промилле.

Результаты опытов в целом были однозначными. Кастрированные самки оказались менее пригодными для опытов с инкубацией, чем неполовозрелые, у которых исходный митотический индекс в эпителии матки был выше, что позволяло более точно оценивать достоверность получаемых данных.

В табл. 19 приведены результаты трех опытов на неполовозрелых мышах.

Таблица 19

Средний митотический индекс в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей при действии эстрона в условиях инкубации

Номер опыта	Доза эстрона, γ	Митотический индекс, ‰			
		эпителий матки		эпителий роговицы	
		опыт	контроль	опыт	контроль
8	5	1,81±0,5	0,45±0,1	0,11±0,05	0,68±0,2
		P>0,05		P=0,01	
9	5	1,12±0,3	0,65±0,2	0,55±0,1	0,95±0,1
		P>0,05		P<0,01	
10	10	4,68±1,3	1,2±0,4	0,70±0,2	0,90±0,2
		P>0,05		P>0,05	

Как следует из табл. 19, средний митотический индекс у подопытных животных в эпителии матки во всех трех опытах выше, в эпителии роговицы, напротив, ниже, чем в контроле.

Таблица 20

Остановка митозов колцемидом в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей при действии эстрона

Инкубируемая ткань		Число митозов по фазам			
		профаза	метафаза	анафаза	телофаза
Эпителий роговицы	опыт	0	127	1	0
	контроль	4	202	0	1
Эпителий матки	опыт	1	105	0	2
	контроль	3	58	0	3

В табл. 20 приведены данные по соотношению фаз митоза в исследуемых тканях (опыт № 9 из табл. 19). Эти данные указывают на то, что в опыте и в контроле колцемид останавливает все митозы на стадии метафазы. Поскольку колцемид добавляли всегда через 1 час после начала инкубации, а продолжительность митоза в обеих тканях равна примерно 1 часу, то, следовательно, все остановленные митозы представляют собой клетки, вступившие в деление уже во время инкубации. Поэтому причиной снижения митотического индекса в эпителии роговицы является не ускорение прохождения клетками видимых фаз митоза, а торможение вступления их в митоз. Точно так же повышение митотического индекса в эпителии матки вызвано не замедлением протекания митоза, а более быстрым переходом клеток к делению. Таким образом, при добавлении в инкубационную среду эстрона в количествах 5 и 10 γ в эпителии матки наблюдалась тенденция к повышению митотической активности, по-

вторявшаяся из опыта в опыт. Однако этот стимулирующий эффект эстрона вряд ли было бы правомерно отождествлять с его действием при введении в организм животного, когда в эпителии матки происходит быстрое и многократное увеличение митотического индекса, причем этот феномен, как уже говорилось, прослежен в пределах достаточно обширной шкалы доз — от 0,1 до 200 γ на мышь (Tice, 1961).

Определенное несоответствие между данными, получаемыми в опытах in vivo и в условиях инкубации in vitro, было обнаружено при исследовании действия эстрона на деление клеток в эпителии роговицы. Как было показано в предыдущем разделе, введение гормона мышам вызывало повышение митотического индекса этой ткани, в то время как инкубация глаз в присутствии эстрона приводила к снижению в ней числа клеточных делений. Угнетение митотической активности в эпителии роговицы мышей через 1 час после непосредственного нанесения на глаз эстрадиола в различных концентрациях наблюдали Тети и Ланглуа (Téti et Langlois, 1954).

По-видимому, одной из основных причин расхождения результатов, получаемых при исследовании влияния эстрона на деление клеток путем введения его в организм животного, с одной стороны, и в инкубационную среду, с другой, является кратковременность проводимых в последнем случае наблюдений, не позволяющая проследить конечный эффект действия гормона. Метод инкубации органов по Буллоу ограничен возможностью исследовать лишь узкую часть митотического цикла, включающую в себя в основном митоз и предшествующий ему период. Это обстоятельство заставляет признать, что данный метод, представляющий несомненную ценность для изучения факторов, непосредственно влияющих на вступление клеток в митоз и его прохождение, недостаточен без сочетания с другими методами для изучения действия гормонов на весь митотический цикл и вследствие этого для установления общих закономерностей гормональной регуляции деления клеток.

Вместе с тем данные, полученные в опытах с инкубацией, свидетельствовали и против предположения Буллоу об универсальном характере действия эстрогенов как энергетических стимуляторов деления клеток, поскольку в эпителии роговицы при инкубации с эстроном по методу Буллоу наблюдалась не стимуляция, а торможение митотической активности. Во всяком случае, если эстрогены и способны выступать в качестве стимуляторов притока энергии для осуществления митоза, то в опытах с инкубацией органов по Буллоу этого выявить не удалось.

Для решения вопроса предстояло исследовать действие эстрона на отдельные периоды митотического цикла эпителия матки и эпителия роговицы. Изложению этих данных посвящена гл. VIII.

Глава VIII.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ И КИНЕТИКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ

1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследование было выполнено методом радиоавтографии. Метод радиоавтографии позволяет изучать жизнедеятельность клеток с помощью радиоактивных изотопов. Метод основан на введении в исследуемый объект радиоактивного метаболита («метки») и выявлении его локализации путем фотографической регистрации излучения. Таким образом, радиоавтография является способом получения изображений (автографов) в результате воздействия на фотоэмульсию радиоактивного вещества, заключенного в объекте. Это изображение представляет собой скопление зерен восстановленного серебра фотоэмульсии над местом расположения радиоактивного вещества в исследуемом материале (подробно см. Boyd, 1955; Fitzgerald, 1955, 1959; Грачева и др., 1960; Жинкин, 1959; Жинкин и др. 1960). В качестве радиоактивного индикатора в наших опытах применялся тимидин, меченный тритием.

Метод радиоавтографии с применением H^3*-тимидина.* Тритий (H^3) является единственным радиоактивным изотопом водорода; период его полураспада составляет 12,4 года. Возникающие при распаде трития β-частицы обладают малой энергией (0,0057 *мэв*), что на порядок меньше энергии β-частиц радиоактивного углерода C^{14}, и как следствие небольшой длиной пробега в веществе (в фотоэмульсии до 1 μ). По данным Хьюза (W. L. Hughes, 1958), почти вся энергия β-частиц трития при радиоактивном распаде в живых тканях локализуется внутри сферы диаметром 1 μ. Это создает большие возможности для применения трития в радиоавтографии, обеспечивая высокую точность расположения зерен серебра над местом включения изотопа.

Первые автографы с использованием трития были изготовлены еще в 1951 г., однако широкое применение его в радиоавтографии началось после того, как в Брукхэвенской национальной лаборатории (США) был получен H^3-тимидин. Благодаря тому, что водород содержится почти во всех метаболитах,

тритием можно пометить огромное количество соединений. В молекулу тимидина тритий вводят в одно из двух положений, указанных на рис. 29.

Тимин, входящий в состав тимидина, представляет собой единственное из четырех азотистых оснований, образующих полинуклеотидную структуру ДНК, которое характерно только для молекулы ДНК. Поэтому меченый тимидин используется клеткой почти исключительно для синтеза ДНК, являясь ее специфическим предшественником.

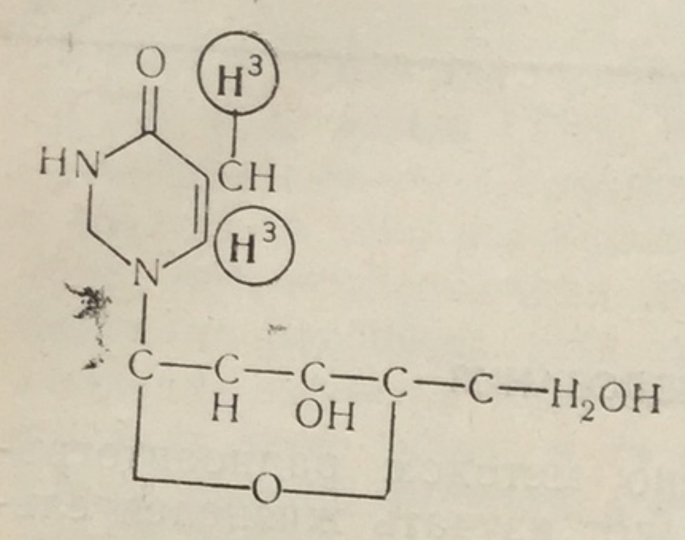


Рис. 29. Формула H^3-тимидина. Тритий может быть введен в любое из двух положений, обозначенных на рисунке

К числу больших достоинств H^3-тимидина как меченого индикатора относятся быстрота его включения в структуры, синтезирующие ДНК, и относительно недолгое пребывание в организме. На примере различных тканей млекопитающих было показано, что уже через несколько минут после введения H^3-тимидина последний включается в ДНК, а свободный H^3-тимидин подвергается катаболизму до тритиевой воды и продукты его распада выводятся из организма в течение 1 часа после инъекции (W. L. Hughes, 1958; Potter, 1959; Rubini et al., 1960, 1962).

Благодаря этим особенностям H^3-тимидина, мечеными оказываются только те клетки, которые в момент его введения синтезируют ДНК (см. гл. II), что позволяет в дальнейшем прослеживать судьбу таких клеток и изучать динамику всей клеточной популяции. Подобный же анализ можно проводить и на отдельных хромосомах.

Принципы радиоавтографического анализа митотических циклов и кинетики клеточных популяций in vivo были разработаны сотрудниками Брухэвенской национальной лаборатории во главе с Квастлером (Quastler a. Sherman, 1959; Quastler, 1960, 1963c; Sherman a. Quastler, 1960), а затем расширены и дополнены другими исследователями (Mendelsohn, 1960, 1962, 1963; Mendelsohn et al., 1960; Fry et al., 1961; H. A. Johnson, 1961; Kisieleski et al., 1961; Lesher et al., 1961; Oehlert u. Büchner, 1961; Baserga a. Kisielski, 1962a, b; Koburg u. Maurer, 1962; Pelc, 1962; Дондуа и Дондуа, 1964, и др.).

Определение продолжительности периодов митотического цикла по изменению процента меченых митозов. Этот метод основан на тех же приемах, которые были описаны Говард и Пелком (Howard a. Pelc, 1951a, b, 1953), использовавшими в качестве индикатора синтеза ДНК в клетках Vicia faba радиоактивный фосфор P^{32} (см. гл. II, раздел 1).

При введении в организм H^3-тимидина в любой популяции мечеными оказываются лишь те клетки, которые в данный момент синтезируют ДНК, то есть находятся в S-периоде митотического цикла (см. рис. 9). Учитывая быстроту включения H^3-тимидина в ДНК и его недолгое пребывание в организме, можно принять, как это делает Квaслер, что число новых клеток, пере-

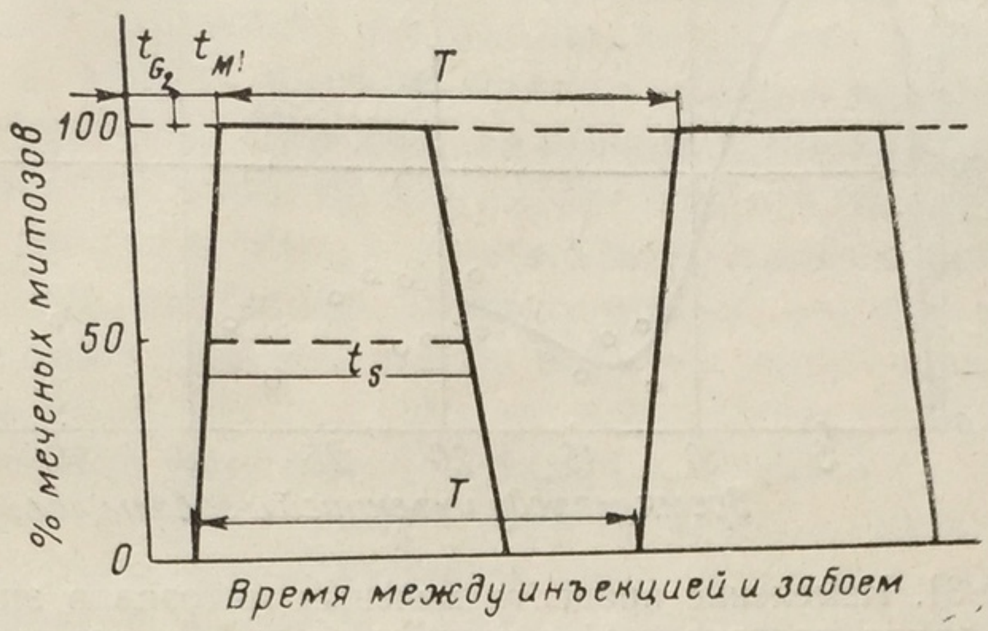


Рис. 30. Изменение процента меченых митозов в различные сроки после введения H^3-тимидина. Гипотетический случай, когда величина каждого периода митотического цикла постоянна для всех клеток. По Квастлеру и Шерману (Quastler a. Sherman, 1959)

t_{G_2} — продолжительность периода G_2; t_M — продолжительность митоза; t_S — продолжительность S-периода; T — продолжительность митотического цикла (время генерации)

ходящих в это время в S-период из пресинтетического периода G_1, настолько незначительно, что им можно пренебречь. Таким образом, клетки, находящиеся в момент введения изотопа в G_1 и G_2-периодах, а также в процессе митоза, не будут содержать метки.

Продолжительность периодов митотического цикла можно определить графически (Quastler a. Sherman, 1959), регистрируя изменения процента меченых митозов в различные промежутки времени после однократной инъекции H^3-тимидина (рис. 30).

Первыми мечеными клетками, вступающими в митоз, будут те клетки, которые при введении изотопа находились в самом конце S-периода. Следовательно, время от момента инъекции H^3-тимидина до появления первых меченых митозов (t_{G_2}) является минимальным временем постсинтетического (премитотического) периода G_2.

В дальнейшем в митоз вступают все новые порции меченых клеток и число меченых митозов соответственно нарастает, а затем начинает снижаться и достигает нуля, когда запас меченых

клеток полностью истощается, то есть когда заканчивают деление те клетки, которые в момент введения H^3-тимидина находились в самом конце S-периода. Период времени от появления первых меченых митозов до их исчезновения является максимальным

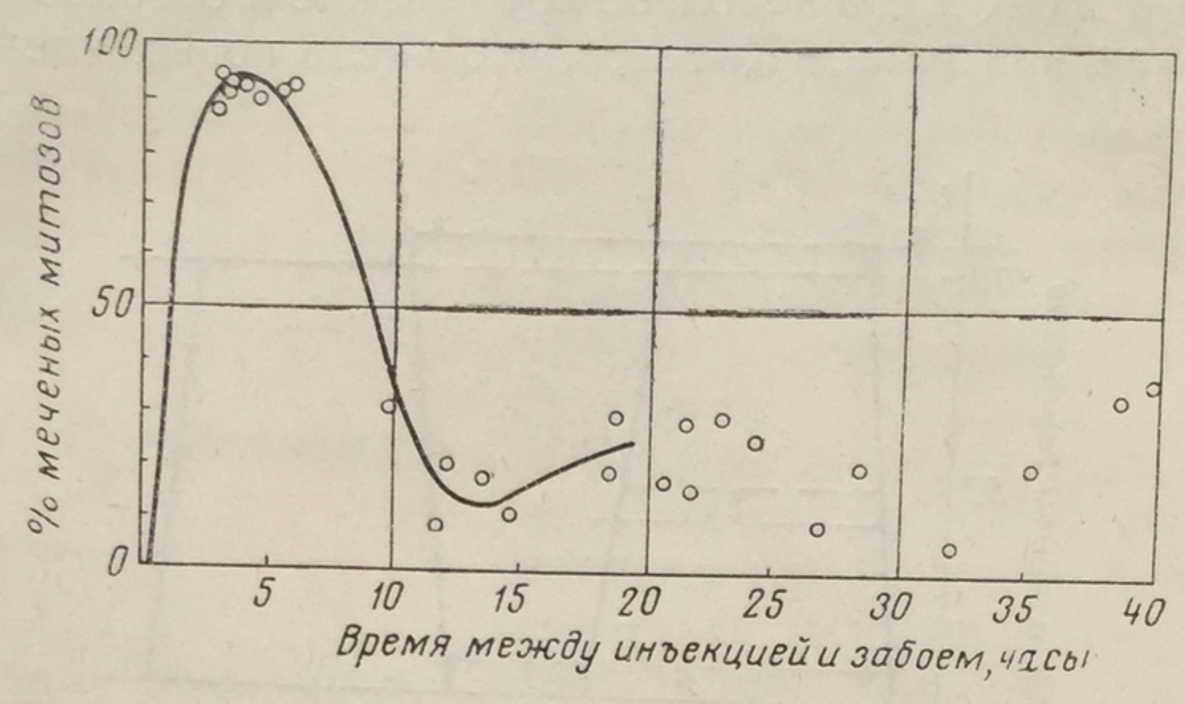


Рис. 31. Изменение процента меченых митозов в эпителии крипт подвздошной кишки у мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина (Quastler a. Sherman, 1959)

временем S-периода. За среднюю продолжительность S-периода (t_s) Квастлер и Шерман предлагают принимать тот интервал времени, в течение которого наблюдается свыше 50% меченых митозов.

Пройдя весь цикл, клетки вновь начинают делиться, и на автографах снова появляются меченые митозы. Отрезок времени между двумя максимумами меченых митозов соответствует продолжительности всего митотического цикла или времени генерации (T). Длительность пресинтетического (постмитотического) периода G_1 определяют путем следующего расчета: $t_{G_1} = T - (t_s + t_{G_2} + t_м)$. Поскольку указанный метод позволяет лишь очень приблизительно судить о продолжительности митоза ($t_м$), эту величину обычно находят в отдельном опыте, одним из способов, разобранных в разделе 8 гл. VII.

Кривая, изображенная на рис. 30, отражает гипотетический случай, когда продолжительность каждого периода митотического цикла является величиной, постоянной для всех клеток. В этих условиях должно наблюдаться регулярное чередование во времени одинаковых подъемов и спадов процента меченых митозов. Однако в силу вариабильности прохождения клетками периодов митотического цикла кривые, получаемые в эксперименте, носят несколько иной характер (рис. 31).

Проследив за изменениями процента меченых митозов в эпителии кишечника у мышей после однократной инъекции H^3-тимидина, Квастлер и Шерман (Quastler a. Sherman, 1959) обна-

ружили, что крутому подъему левой части кривой противостоит относительно пологий спуск правой ее части. Наклон этого спуска отражает, по мнению авторов, скорость, с которой клетки входят в S-период, а также свидетельствует о неодинаковой продолжительности S-периода у отдельных клеток. Вследствие вариабильности в прохождении клетками периодов G_1 и G_2 в экспериментальных условиях не наблюдается ста процентов меченых митозов, а второй подъем кривой обычно значительно ниже первого (см. рис. 31). Помимо различий в прохождении клетками митотических циклов, на характере кривой изменения процентов меченых митозов могут отражаться ошибки метода радиоавтографии. Так, например, недостаточную высоту второго пика кривой объясняют тем, что после второго деления митозы содержат слишком мало метки и уже не могут быть зарегистрированы на автографах как меченые (Peckham a. Kiekhofer, 1962).

Существуют приемы, позволяющие контролировать правильность определения продолжительности периодов митотического цикла по проценту меченых митозов. Критерием того, что разделились все клетки, находившиеся в момент введения H^3-тимидина в S-периоде, может служить удвоение числа меченых клеток. В противоположность этому среднее число зерен серебра на клетку должно уменьшаться после каждого деления в два раза. По наблюдению Квастлера и Шермана, это «разбавление метки» протекает с некоторым ускорением, которое может быть отнесено за счет невозможности выявления клеток с малым числом зерен, а также распада части клеток, включивших наибольшее количество изотопа.

Определение продолжительности S-периода и времени генерации в системах, находящихся в стационарном состоянии. Системы, находящиеся в стационарном состоянии, или steady state (см. гл. I, раздел 2), должны удовлетворять следующим требованиям: а) число клеток, поступающих в какую-либо часть системы, например в один из периодов митотического цикла, всегда равно числу клеток, выходящих из этой части (периода); б) отношение числа клеток в любом периоде цикла (n_i) ко времени пребывания их в этом периоде (t_i) есть величина постоянная и равная отношению общего числа клеток (N) к продолжительности всего митотического цикла, или времени генерации (T):

$$\frac{ni}{t_i} = k = \frac{N}{T}, \tag{1}$$

откуда

$$\frac{n_i}{N} = \frac{t_i}{T} \tag{2}$$

(ср. с уравнением (3) в гл. VII).

Пользуясь этим уравнением, можно вычислить продолжительность S-периода (t_s), если известны индекс меченых клеток ($I=\frac{n_s}{N}$) и величина T; точно так же, зная продолжительность S-периода, можно определить время генерации клеток (Quastler a. Sherman, 1959; Quastler, 1960).

Понятие о «пролиферативном пуле». Определяемая таким образом величина T отражает лишь среднее время генерации, так как не все клетки исследуемой популяции участвуют в митотическом цикле, синтезируют ДНК и в дальнейшем вступают в деление. Отношение числа пролиферирующих клеток к общему числу клеток популяции составляет ее «пролиферативный пул» (Kisieleski et al., 1961), или «фракцию роста» (Mendelsohn, 1962).

Поскольку в тканях млекопитающих пролиферативный пул (P_c) обычно бывает ниже 100%, в расчеты необходимо вносить соответствующую поправку; в противном случае время генерации будет завышено, как это имело место в работах Джонсона и др. (H. A. Johnson et al., 1960; H. A. Jonson a. Bond, 1961).

Для экспериментального определения величины P_c in vivo в организм вводят H^3-тимидин через промежутки времени, меньшие, чем продолжительность S-периода, и на протяжении всего времени генерации. Определив в конце опыта индекс меченых клеток в исследуемой ткани, получают представление об общем числе клеток, способных к прохождению митотического цикла и синтезу ДНК.

Чем выше пролиферативный пул и короче митотический цикл ткани, тем точнее можно определить продолжительность отдельных периодов цикла.

Условия проведения опытов. Как и в первой части работы (гл. VII), объектом исследования служили эпителий матки и эпителий роговицы мыши. Подопытными животными являлись в основном самки линии CBA, а также беспородные мыши весом 20—25 *г*. Всего под опытом находилось около 150 мышей.

В работе был использован H^3-тимидин производства Радиохимического центра в Англии (The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England) — удельная активность 2,5 *C/mM* и Бельгийского центра ядерной энергии (Laboratoires du C. E. N. a Mol-Donk, Belgique) — удельная активность 3,0 *C/mM*.

В большей части опытов H^3-тимидин вводили мышам внутрибрюшинно из расчета 0,6 *μC/г* в 0,1 *мл* физиологического раствора (см. W. L. Hughes, 1958; Жинкин и др., 1961). В тех случаях, когда исследовали только роговицу, H^3-тимидин закапывали

мышам прямо в глаз (по 1 μC). Такой способ введения меченого тимидина обусловлен особенностями строения роговицы (см. гл. VII, раздел 1); он обеспечивает быстрый контакт ткани с метаболитом, позволяя значительно сокращать время экспозиции, и намного превосходит по простоте метод введения H^3-тимидина в переднюю камеру глаза (Hanna a. O'Brien, 1960, 1961; Hanna et al., 1961).

Животных забивали в разные сроки после введения H^3-тимидина (в зависимости от условий опыта).

Для фиксации обеих изучаемых тканей применяли жидкость Карнуа. По данным лаборатории Лёблона (Kopriwa a. Leblond, 1962), этот фиксатор обеспечивает в радиоавтографических исследованиях наилучшее выявление соединений, меченных тритием.

Время фиксации матки составляло, как и при изготовлении обычных гистологических препаратов, 30 мин., роговицы — 1 час (подробно см. гл. VII, раздел 1).

Для получения автографов изготовляли поперечные срезы через рог матки (5 μ) и роговицу (4 μ). Срезы наклеивали на предметные стекла стандартной толщины, после чего обычным способом освобождали от парафина и проводили по спиртам нисходящей концентрации до 96° спирта.

Автографы готовили на жидкой ядерной эмульсии типа «М» (средний диаметр непроявленных зерен серебра меньше 0,3 μ), выпускаемой Научно-исследовательским кинофотоинститутом (НИКФИ) в Москве (Богомолов и др., 1957). Эта эмульсия, многократно апробированная в исследованиях на различных объектах, обладает большой разрешающей способностью (см. Aurisicchio et al., 1960; Жинкин и др., 1961, и др.).

Перед нанесением на срезы эмульсию расплавляли в ультратермостате при 45°. Препараты погружали в стаканчик с эмульсией, после чего им придавали горизонтальное положение. Все манипуляции проводили при свете фонаря с желто-зеленым светофильтром.

Препараты с нанесенной эмульсией помещали в светонепроницаемые ящики и экспонировали при комнатной температуре. Автографы матки получали при двухнедельной экспозиции. Время экспозиции автографов роговицы составляло два месяца при внутрибрюшинном введении H^3-тимидина и пять дней при закапывании в глаз.

Проявление автографов производили при 18—20° в тех же условиях освещения, что и нанесение эмульсии. Применяли амидоловый проявитель следующего состава: амидол 3 *г*, сульфит безводный 10 *г*, дистиллированная вода 1 *л*, лимонная кислота 0,6 *г* (до pH 6,7 проявляющего раствора). Время проявления автографов составляло 2 мин.

Фиксацию проводили в 40%-ном растворе гипосульфита до

просветления эмульсии (в течение 10—15 мин.), после чего автографы промывали холодной проточной водой в течение 20—30 мин.

Автографы окрашивали по Фёльгену и гематоксилином Майера, а затем обезвоживали и заключали в бальзам. Окраску по Фёльгену производили до нанесения эмульсии с целью предотвращения возможных артефактов (Жинкин и др., 1961); окрашенные препараты проводили до 96° спирта и высушивали перед нанесением эмульсии. Окраску гематоксилином Майера производили обычным способом после проявления автографов.

Автографы исследовали при том же увеличении (окуляр 7×, объектив 90×), которым пользовались для подсчета митозов в первой части работы (см. гл. VII, раздел 1).

На препаратах подсчитывали число меченых и немеченых митозов (как правило, 70—100 митозов в 6000 и более клеток), число меченых и немеченых клеток (подсчитывали 2000 клеток) и количество зерен серебра на меченую клетку (в 50 клетках) в эпителии, выстилающем полость матки, и в базальном слое эпителия роговицы. В некоторых опытах исследовали также эпителий маточных желез.

Митотический индекс (*MI*) выражали отношением числа митозов к общему числу клеток в промилле, индекс меченых клеток (*I*) — отношением числа меченых клеток к общему числу клеток в процентах.

Статистическую обработку материала проводили по тем же методам, что и в первой части исследования.

2. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ И КИНЕТИКУ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ[1]

В первой части работы было показано, что введение мышам эстрона повышает митотический индекс как в ткани-мишени (эпителий матки), так и в неспецифической ткани (эпителий роговицы), но в первом случае многократно, а во втором — лишь в полтора раза. С помощью колхицина было установлено, что время самого митоза ни в той, ни в другой ткани не меняется, а продолжительность интерфазы сокращается пропорционально увеличению митотического индекса. Оставалось неясным, на какой именно период митотического цикла каждой ткани действует эстрон.

В первую очередь предстояло исследовать изменения, вызываемые введением эстрона в митотическом цикле эпителия матки, а также в составе всей популяции эпителиальных клеток.

Вопрос этот никем специально не изучался, и данные о действии эстрогенов на митотический цикл эпителия матки в литературе отсутствуют. Имеются лишь единичные работы, в кото-

[1] См. Епифанова, 1962б, 1963, 1964.

рых учитывалась динамика включения H^3-тимидина в ДНК клеток эпителия матки мыши на некоторых стадиях эстрального цикла (B. E. Walker, 1959, 1960) и после однократной инъекции эстрадиола (Perrotta, 1962). Во всех случаях под влиянием эстрогенов происходило увеличение числа меченых клеток, которое опережало по времени подъем митотической активности, из чего был сделан вывод (Perrotta, 1962) о том, что действие эстрогенов на деление клеток в эпителии матки связано со стимуляцией синтеза ДНК.

Несколько более подробно исследован вопрос о влиянии эстрогенов на митотический цикл и кинетику клеточной популяции эпителия влагалища мыши (Perrotta, Quastler a. Staley, 1961) и крысы (Peckham, a. Kiekhofer, 1962; Peckham, Barash et al., 1963; Peckham, Ladinsky a. Kiekhofer, 1963).

Пекхэм и Кикхофер (Peckham a. Kiekhofer, 1962) ежедневно вводили кастрированным крысам по 1,25 γ диэтилстильбэстрола в течение двух недель (для установления состояния steady state) и определили методом радиоавтографического анализа с H^3-тимидином, что в этих условиях продолжительность митотического цикла клеток базального слоя эпителия влагалища составляет 13,5 часа (при $t_{G_2}<45$ мин. $t + t_м = 1^3/_4$ часа, $t_s = 6$ час., $t_{G_1} = 5^1/_2$ час.). К сожалению, в работе отсутствуют данные о митотическом цикле той же ткани кастрированных животных, не получавших гормона (контроль), что не позволяет судить о том, на какие периоды цикла действовал эстроген.

В аналогичных опытах с большей дозой диэтилстильбэстрола (10 γ) наблюдалось резкое сокращение продолжительности митотического цикла эпителия влагалища — до 4 (!) час. при полном исчезновении периода G_2 (Peckham, Ladinsky a. Kiekhofer, 1963). Однако авторы не смогли объяснить, почему в этих условиях время обновления всего эпителиального пласта изменялось очень незначительно (с 30—45 до 28—36 час.). По-видимому, этот вопрос нуждается в дальнейшем исследовании с применением контрольных приемов анализа.

Перечисленные работы показывают, что точки приложения действия эстрогенов в митотическом цикле тканей-мишеней пока еще остаются неизвестными. Описываемые ниже опыты посвящены исследованию этого вопроса.

Для определения продолжительности митотического цикла и его периодов в эпителии матки в опыт было взято 68 мышей линии CBA весом 25 *г* с предварительно удаленными яичниками. Подопытным животным (34) произвели через 22 дня после операции двукратную подкожную инъекцию эстрона (по 2,5 γ в 0,1 *мл* масла) с интервалом в сутки. Контрольным животным (34) в те же сроки вводили масло. Через сутки после второй инъекции всем мышам ввели внутрибрюшинно по 15 μ*C* H^3-тимидина с удельной активностью 2,5 *C/mM* в 0,1 *мл* физиологического

раствора. Животные были забиты через 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 72 и 96 час. после введения изотопа. На каждый срок брали по две контрольные и две подопытные мыши.

Автографы матки готовили по способу, описанному в разделе 1. Срезы окрашивали по Фёльгену и гематоксилином Майера. На рис. 32 и 33 представлены микрофотографии некоторых автографов.

Отдельные методические приемы, использованные при постановке дополнительных опытов, будут описаны по ходу изложения результатов.

Прежде всего был определен митотический индекс в эпителии полости матки. Как показал подсчет числа митозов (см. также рис. 41), введение эстрона вызывает многократное увеличение числа митозов в этой ткани, что согласуется с данными, полученными в первой части исследования. Так, в опыте митотический индекс был равен $9{,}8 \pm 1{,}2\%$ (данные на 8 животных), в контроле — $2{,}3 \pm 0{,}35\%$ (данные на 10 животных). Эти различия достоверны ($P < 0{,}0001$).

Далее была сопоставлена продолжительность отдельных периодов митотического цикла в эпителии матки контрольных и подопытных животных (рис. 34).

В верхней части рисунка изображена кривая изменения процента меченых митозов в эпителии полости матки контрольных мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина.

Уже через 1 час после инъекции можно наблюдать первые меченые митозы (профазы и метафазы). Как видно на рисунке, количество меченых митозов в контроле (верхняя часть рисунка) составляет 50% через 1,5 часа после введения H^3-тимидина и, достигнув пика, вновь доходит до 50% через 10 час. Этот отрезок времени, равный примерно 8,5 часа, представляет собой, по Квастлеру и Шерману (см. раздел 1), среднее время периода синтеза ДНК (t_s).

Как уже было сказано, время генерации (T), или продолжительность митотического цикла, можно определить по расстоянию между двумя максимумами меченых митозов, которое в нашем случае равно 42 час. Митоз ($t_м$) длится в эпителии матки кастрированных мышей ~ 1 час (см. гл. VII, раздел 8). Зная все перечисленные величины, можно рассчитать и время пресинтетического периода $G_1 : t_{G_1} = 42$ ч — (1 ч + 1 ч + 8,5 ч) = 31,5 часа.

В нижней части рис. 34 представлены аналогичные данные, полученные на подопытных животных. Продолжительность периода G_2 здесь также равна ~ 1 часу, но время S-периода сокращается до 5,5 часа, а всего митотического цикла — до 26 час. Поскольку длительность митоза в эпителии матки при введении эстрона не меняется (см. гл. VII, раздел 8), время периода G_1 будет равно 26 ч — (1 ч + 1 ч + 5,5 ч) = 18,5. час.

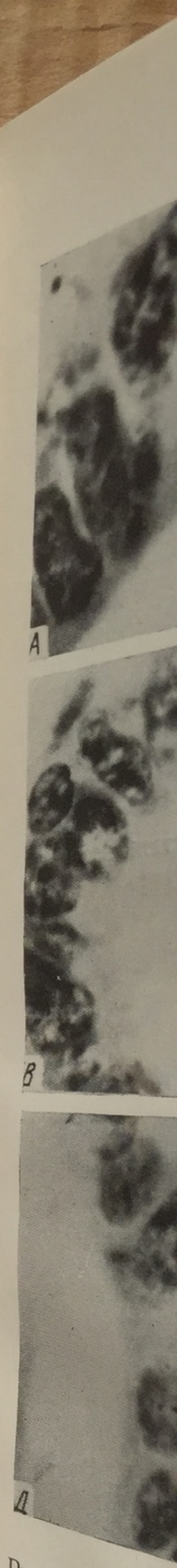


Рис. 32. Три авт
на, через 4 часа
(5 μ), эмульсия
А, Б — первый, В,
рован на клетки,

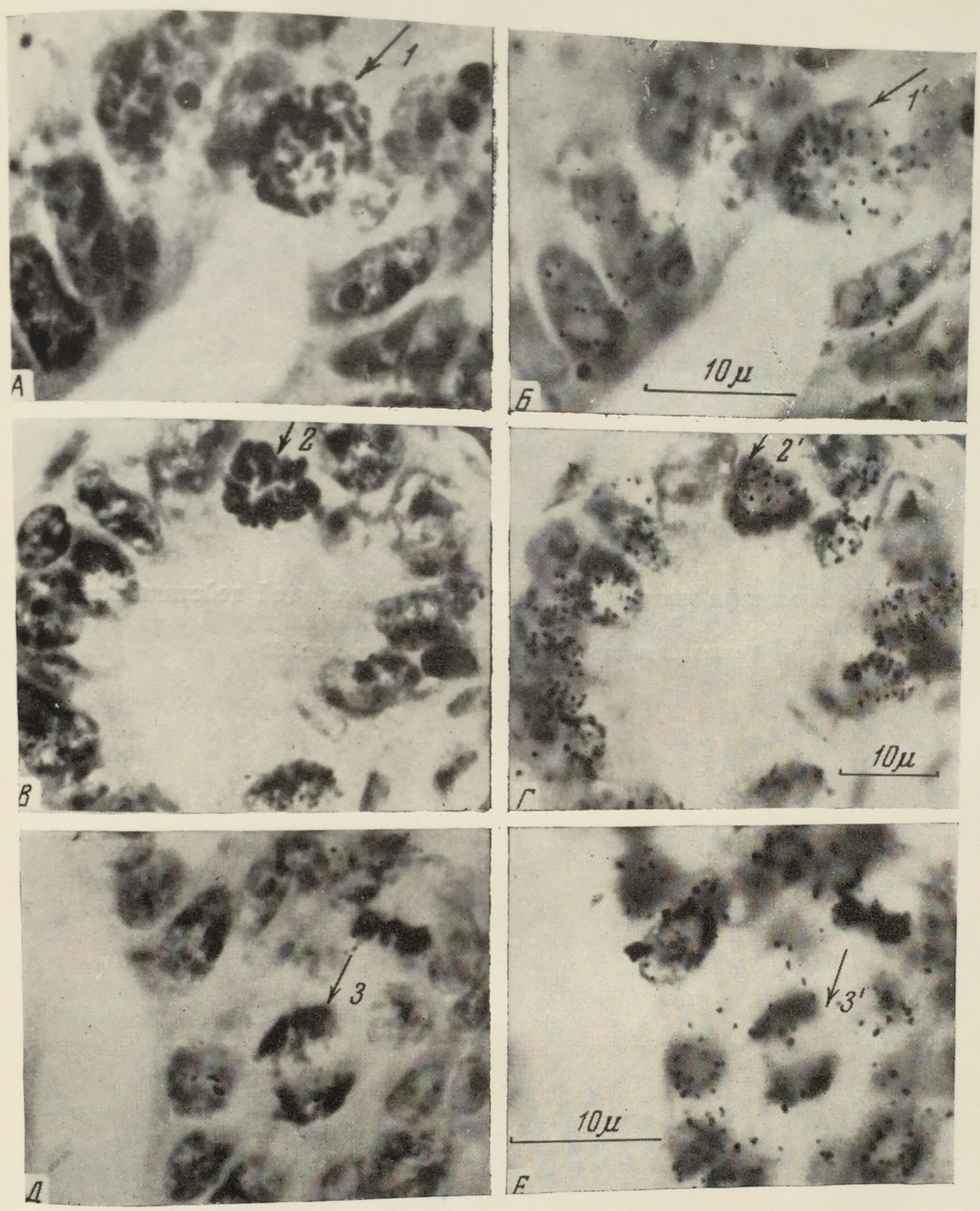


Рис. 32. Три автографа эпителия матки мыши, подвергнутой действию эстрона, через 4 часа после введения H^3-тимидина. Поперечный срез рога матки (5 μ), эмульсия «*М*», экспозиция 14 дней, окраска гематоксилином Майера

А, *Б* — первый, *В*, *Г* — второй, *Д*, *Е* — третий автографы; *А*, *В*, *Д* — объектив сфокусирован на клетки, *Б*, *Г*, *Е* — на зерна серебра, *1* — профаза, *2* — метафаза, *3* — анафаза; *1'*, *2'*, *3'* — зерна серебра над теми же клетками

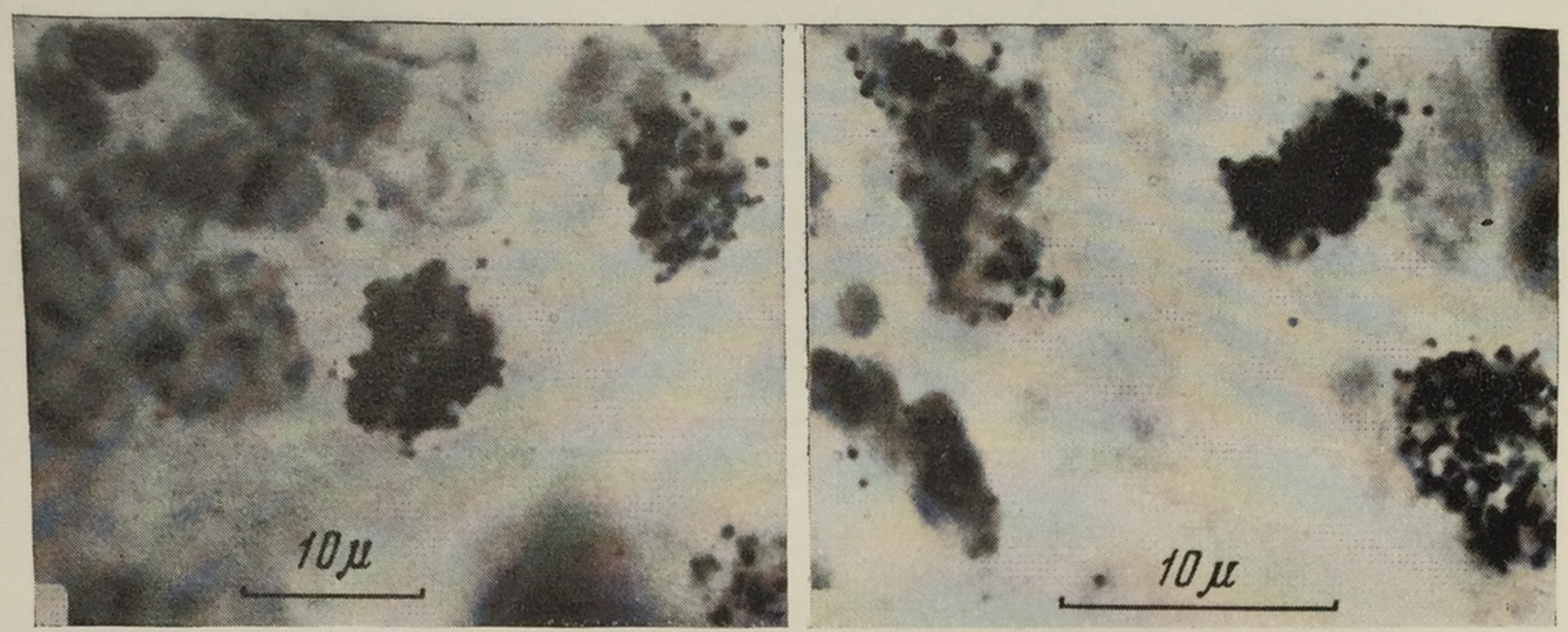


Рис. 33. Два автографа эпителия матки мыши, подвергнутой действию эстрона, через 6 часов после введения H^3-тимидина

Условия приготовления автографов см. рис. 32

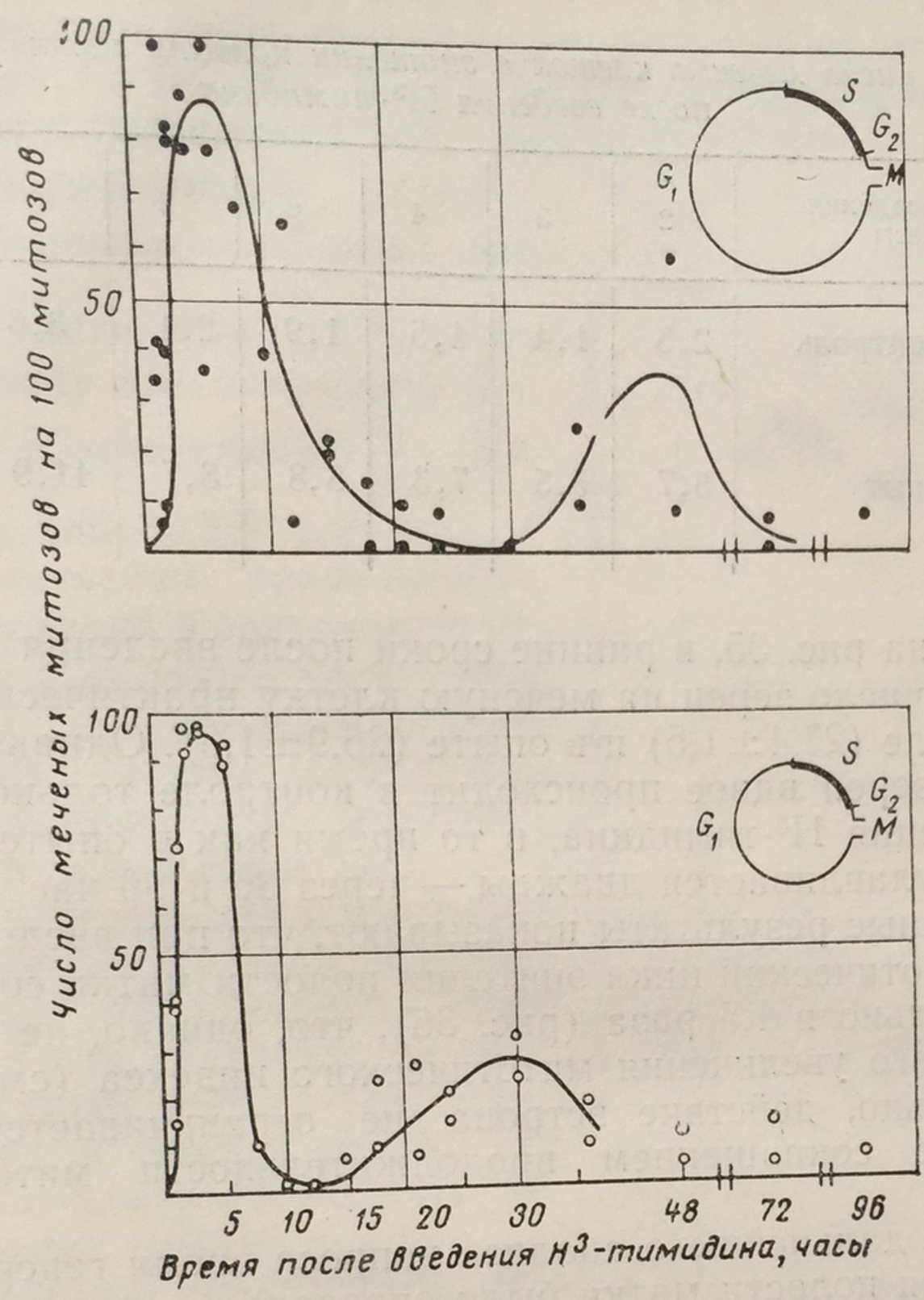


Рис. 34. Изменение числа меченых митозов в эпителии полости матки у мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина

Верхний график — контроль, нижний — опыт. Каждый знак — данные по одному животному (среднее из 50—70 митозов в контроле и 70—100 митозов в опыте)

Данные о продолжительности митотического цикла в эпителии матки контрольных и подопытных мышей находят подтверждение при подсчете процента меченых клеток и среднего числа зерен серебра на меченую клетку.

Когда разделятся все клетки, включившие H^3-тимидин, индекс меченых клеток должен возрасти вдвое. Это удвоение наблюдается в контроле к 15 час., а в опыте к 10 час. (табл. 21), то есть к тому времени, когда завершают деление последние клетки, бывшие в S-периоде (см. рис. 34).

Среднее число зерен серебра на клетку, напротив, должно уменьшиться при делении меченых клеток в два раза; следующая генерация клеток будет содержать еще меньше зерен и т. д.

Таблица 21

Удвоение числа меченых клеток в эпителии полости матки у мышей после введения H^3-тимидина

Время после введения изотопа, часы		2	3	4	6	8	10	12	15
Средний индекс меченых клеток, %	контроль	2,5	1,4	1,5	1,9	2,1	3,6	4,3	5,9
	опыт	5,7	5,5	7,3	8,8	8,7	11,9	—	—

Как видно на рис. 35, в ранние сроки после введения H^3-тимидина среднее число зерен на меченую клетку практически одинаково в контроле ($27{,}4 \pm 1{,}5$) и в опыте ($26{,}9 \pm 1{,}6$). Однако уменьшение числа зерен вдвое происходит в контроле только к 48 час. после введения H^3-тимидина, в то время как в опыте разбавление метки улавливается дважды — через 36 и 96 час.

Полученные результаты показывают, что при введении эстрона весь митотический цикл эпителия полости матки сокращается приблизительно в 1,5 раза (рис. 36), что, однако, не покрывает наблюдаемого увеличения митотического индекса (см. рис. 41). Следовательно, действие эстрона не ограничивается в данном случае сокращением продолжительности митотического цикла.

С целью дальнейшего анализа вопроса время генерации клеток эпителия полости матки было определено по уравнению (2) для систем, находящихся в стационарном состоянии (см. раздел 1):

$$\frac{n_i}{N} = \frac{t_i}{T}.$$

Подставляя в это уравнение значения $\frac{n_s}{N}$ (средний индекс меченых клеток) и t_s (время синтеза ДНК), получаем для контрольных животных: $\frac{2{,}5}{100} = \frac{8{,}5}{T}$, откуда $T = 340$ час.; для подопытных: $\frac{6{,}8}{100} = \frac{5{,}5}{T}$, откуда $T = 80$ час.

Полученные данные значительно превышают величины, установленные при подсчете числа меченых митозов (см. рис. 34), и близки к тем, которые были получены в свое время в опытах с колхицином (см. гл. VII, раздел 8). Так, например, продолжительность времени генерации в эпителии матки контрольных мы-

шей, определенная по уравнению (2), составляет 340 час.; если же судить по появлению второй волны меченых митозов (рис. 34), то она равна 42 час. Это противоречие снимается, если предположить, что митотический цикл проходят не все, а только часть клеток, которую можно рассчитать как отношение $\frac{340}{42} = 8{,}1$ (то есть $\sim 1/8$ часть, или 12,5% клеток). В опыте это отношение будет равно соответственно $\frac{80}{26} = 3{,}1$ ($1/3$ часть, или 32,3% клеток).

Для проверки правильности этих вычислений в эпителии полости матки был экспериментально определен пролиферативный пул — число клеток популяции, способных проходить митотический цикл (см. раздел 1).

С этой целью двум контрольным животным вводили повторно по 15 μC H^3-тимидина через каждые 8 час. в течение 45 час., а двум подопытным — через каждые 5 час. в течение 25 час. По окончании опыта определяли индекс меченых клеток.

Совпадение полученных результатов с теоретическими расчетами оказалось вполне удовлетворительным (табл. 22).

Пролиферативный пул был равен в контроле 8,3%, в опыте — 27,9%, что подтвердило выведенное соотношение 1 : 3.

Другими словами, в эпителии полости матки подопытных животных число клеток, способных проходить митотический цикл, в три раза больше, чем у контрольных.

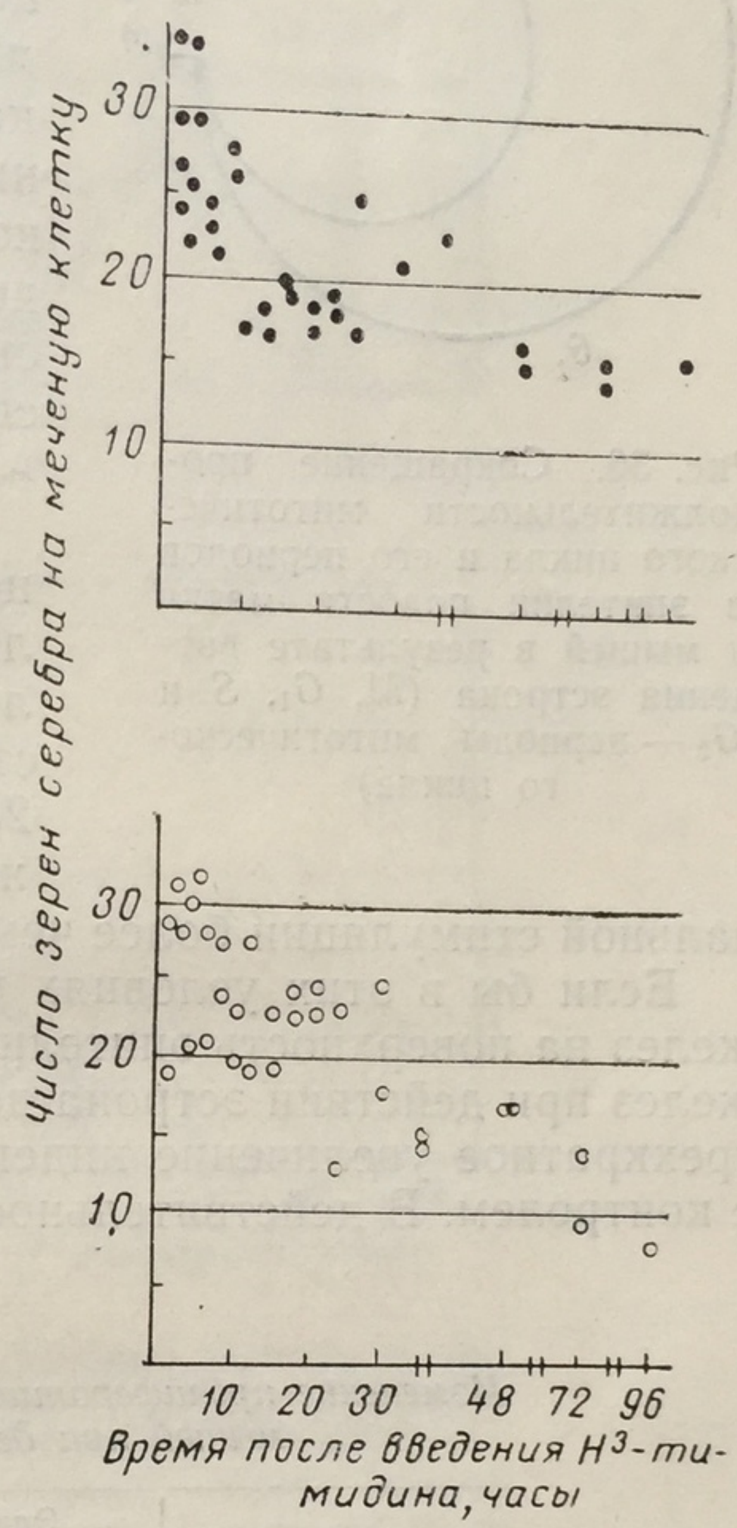


Рис. 35. Уменьшение числа зерен серебра в клетках эпителия полости матки у мышей после введения H^3-тимидина

Верхний график — контроль, нижний — опыт. Каждый знак — данные по одному животному (среднее из подсчета числа зерен в 50 клетках)

Следующим этапом исследования было выяснение вопроса о том, не связано ли наблюдаемое при действии эстрона трехкратное увеличение пролиферативного пула в эпителии полости матки с ускоренным размножением и перемещением клеток из желез на поверхность эпителиального пласта, выстилающего полость.

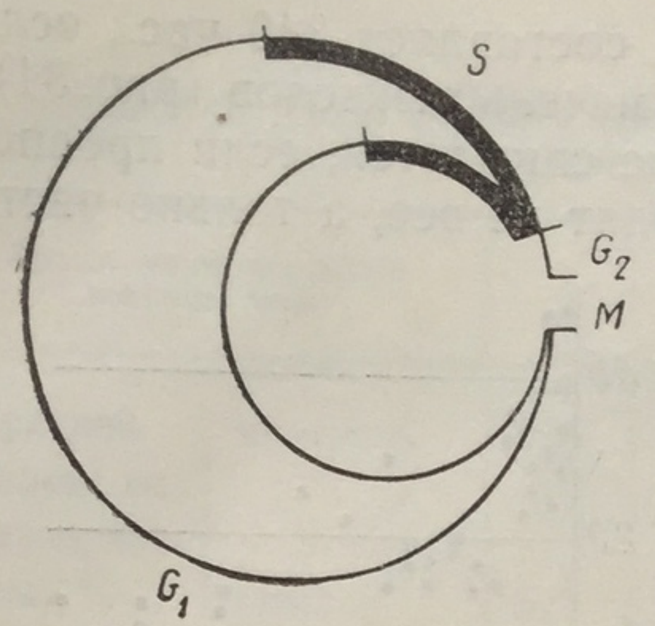


Рис. 36. Сокращение продолжительности митотического цикла и его периодов в эпителии полости матки у мышей в результате введения эстрона (M, G_1, S и G_2 — периоды митотического цикла)

Подсчет числа меченых митозов в различные сроки после введения H^3-тимидина (рис. 37) показал, что продолжительность митотического цикла и его периодов в эпителии желез и в эпителии полости матки как у контрольных, так и у подопытных животных практически одинакова. Следовательно, время прохождения клетками периодов митотического цикла при действии эстрона сокращается и в эпителии желез ~ в 1,5 раза.

Определенный экспериментально пролиферативный пул в эпителии желез оказался значительно более высоким, чем в эпителии полости матки, и равным в контроле 25,7%, в опыте 65,4%, то есть он также возрастал в результате гормональной стимуляции более чем в 2,6 раза (см. табл. 22).

Если бы в этих условиях число клеток, перемещающихся из желез на поверхность эпителия, оставалось прежним, в эпителии желез при действии эстрона должно было бы наблюдаться почти трехкратное увеличение индекса меченых клеток по сравнению с контролем. В действительности этого не происходит.

Таблица 22

Изменение пролиферативного пула в эпителии матки мышей при действии эстрона, %

Группа	Эпителий полости		Эпителий желез (в эксперименте)
	по расчетам	в эксперименте	
Контроль . . .	12,5	8,3	25,7
Опыт	32,3	27,9	65,4

Как следует из табл. 23, у контрольных мышей индекс меченых клеток и митотический индекс примерно в 2 раза выше в эпителии желез, чем в эпителии полости матки, что соответствует различиям в пролиферативном пуле при одинаковой продолжительности митотического цикла.

Введение эстрона нарушает эти соотношения, вызывая повышение митотического индекса как в эпителии желез, так и в эпителии полости матки.

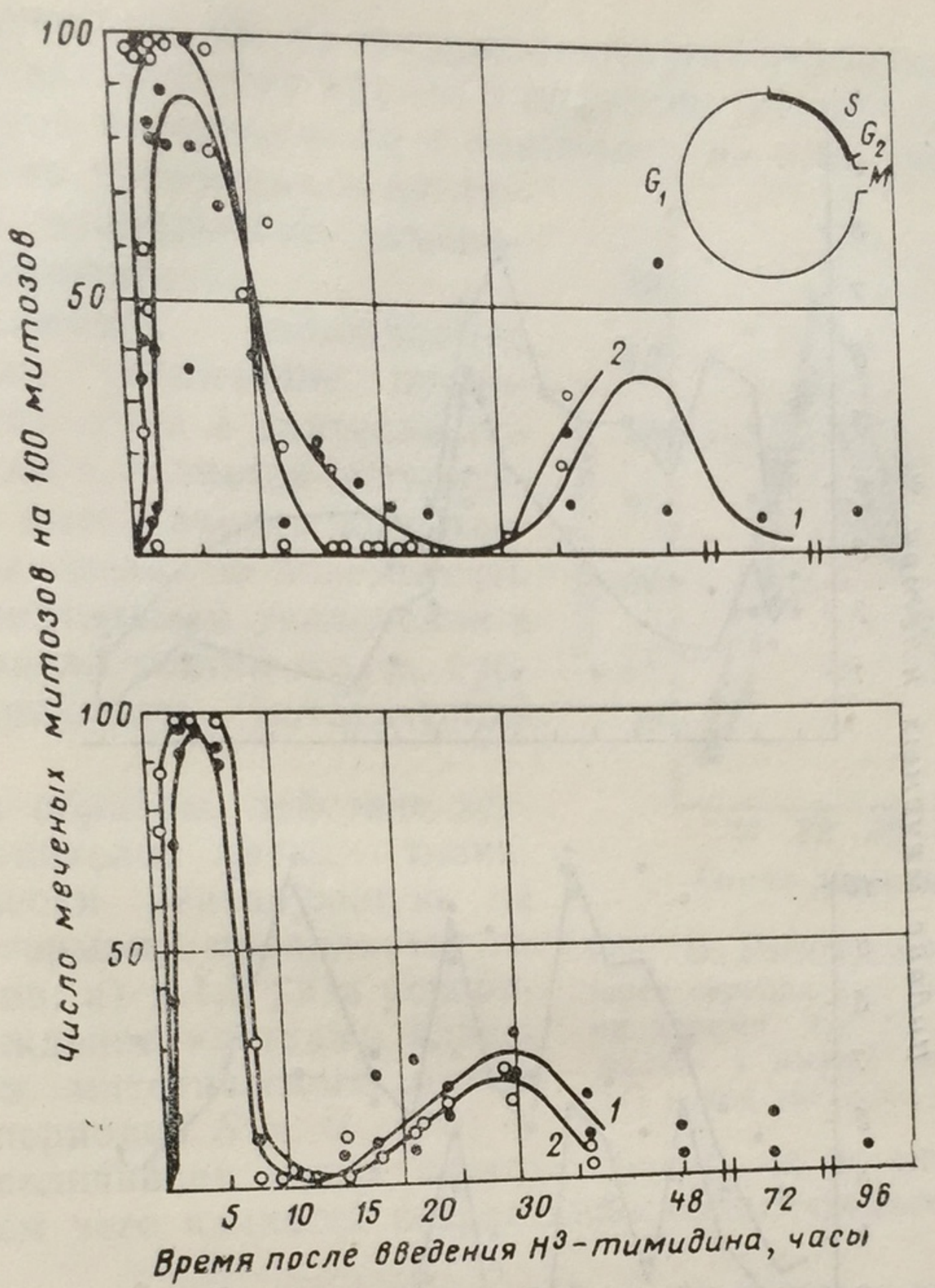


Рис. 37. Изменение числа меченых митозов в эпителии полости (*1*) и желез (*2*) матки у мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина

Верхний график — контроль, нижний — опыт. Каждый знак — данные по одному животному (среднее из 50—70 митозов в контроле и 70 — 100 митозов в опыте)

Таблица 23

Изменение среднего индекса меченых клеток (I) и митотического индекса (MI) в эпителии желез и полости матки у мышей при действии эстрона

Группа	Эпителий полости		Эпителий желез	
	I, %	*MI*, ‰	*I*, %	*MI*, ‰
Контроль . . .	2,5±0,6	2,3±0,3	4,7±0,3	4,3±0,3
	P=0,0001	P<0,0001	P>0,05	P=0,01
Опыт	6,8±1,1	9,8±1,2	4,2±0,5	8,4±1,2

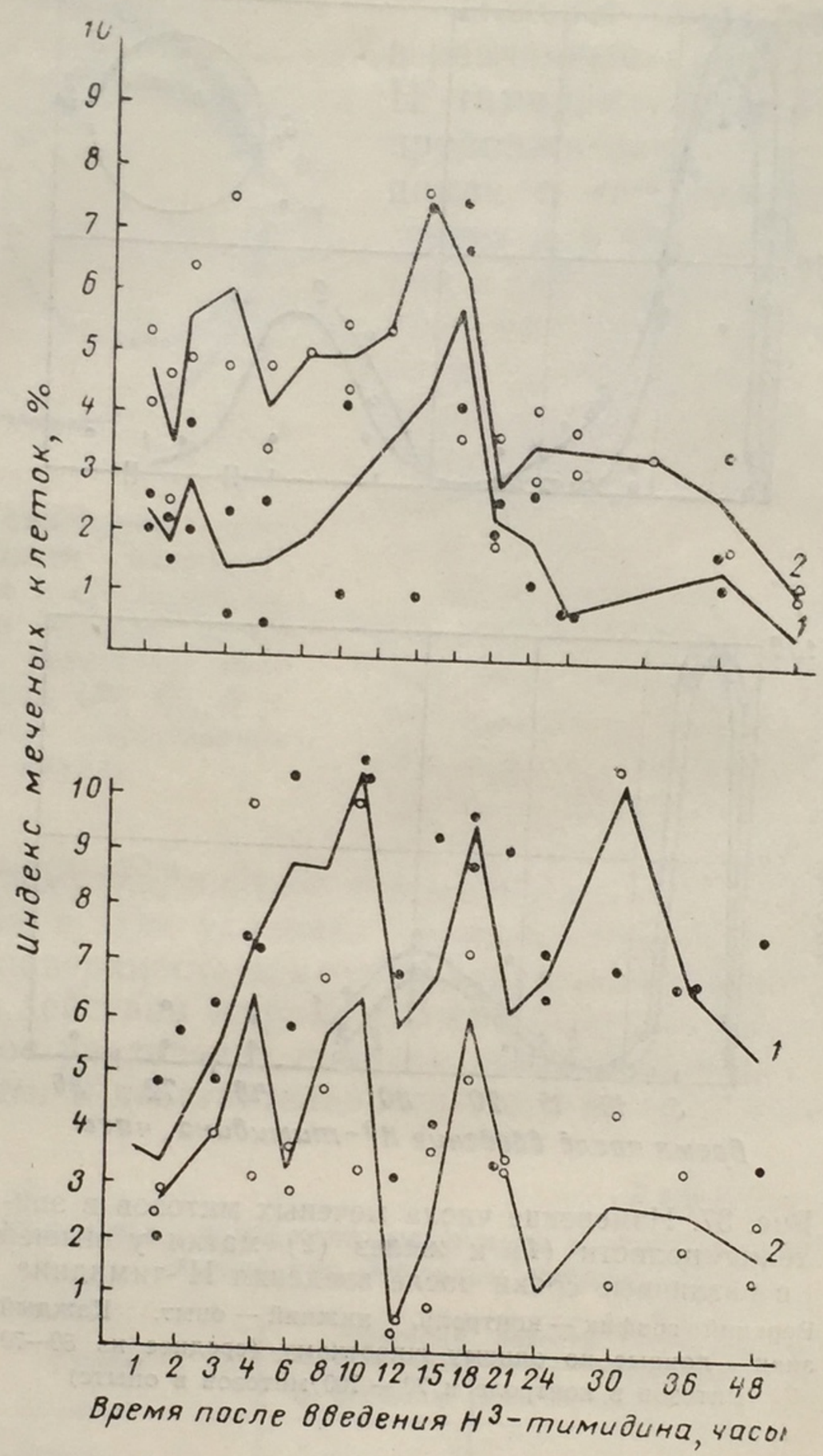


Рис. 38. Изменение индекса меченых клеток в эпителии полости (*1*) и желез (*2*) матки у мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина

Верхний график — контроль, нижний — опыт. Каждый знак — данные по одному животному (среднее из 2000 клеток)

Увеличение митотического индекса в эпителии желез, по-видимому, происходит полностью за счет сокращения времени митотического цикла с 42 до 26 час. Однако индекс меченых клеток при этом не изменяется, что может иметь место только в случае ускоренного перемещения вступивших в цикл клеток из желез на поверхность эпителиального пласта. Эти отношения наглядно

демонстрирует рис. 38, из которого следует, что после введения эстрона индекс меченых клеток в эпителии полости матки резко увеличивается по сравнению с контролем на всех сроках исследования, в то время как в эпителии желез аналогичных изменений не наблюдается.

По-видимому, наблюдаемое трехкратное увеличение пролиферативного пула в эпителии полости матки и является результатом более интенсивного поступления клеток желез на поверхность при действительном увеличении в 2,6 раза числа клеток желез, способных проходить митотический цикл.

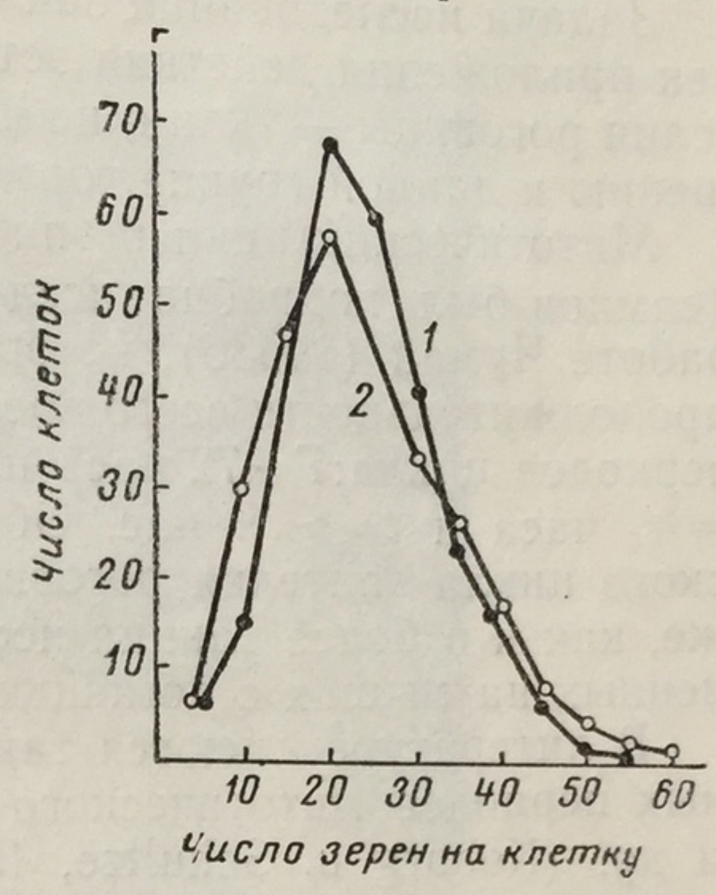


Рис. 39. Распределение числа зерен серебра над интерфазными ядрами эпителия полости матки у мышей в контроле (*1*) и при введении эстрона (*2*)

Таким образом, действие эстрона на эпителий матки — ткань, специфически реагирующую на данный гормон, проявляется в том, что он: а) в 1,5 раза ускоряет прохождение клетками эпителия матки митотического цикла за счет периодов S и G_1 и б) в 3 раза увеличивает число клеток, способных к синтезу ДНК, следствием чего является возрастание митотического индекса в 4,5 раза.

Поскольку в первые исследованные сроки после введения H^3-тимидина среднее число зерен на меченую клетку было одинаковым в опыте и в контроле (см. рис. 35), можно думать, что эстрон не влияет на интенсивность синтеза ДНК в эпителии матки.

Рис. 39 указывает на отсутствие различий в распределении числа зерен серебра над интерфазными ядрами эпителия полости матки в контроле и после введения эстрона. Кривые частоты различных классов ядер в эпителии матки подопытных и контрольных мышей однотипны и носят четкий одновершинный характер (среднее число зерен в опыте 21,8±0,5, в контроле 21,9±±0,5), что свидетельствует против возможности увеличения степени плоидности клеточной популяции эпителия матки при действии эстрона (см. Koburg u. Maurer, 1962).

Можно предположить, что сокращение времени S-периода, регистрируемое по изменению процента меченых митозов, связано со стимулирующим действием эстрона на этапы формирования предшественников ДНК, о чем говорит значительное уменьшение продолжительности пресинтетического периода G_1.

3. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ [2]

Задача исследования заключалась в изучении возможных точек приложения действия эстрогенов в митотическом цикле эпителия роговицы — ткани, не являющейся специфической по отношению к данной группе гормонов.

Митотический цикл в эпителии роговицы мышей линии CBA (самцов был подробно исследован методом радиоавтографии в работе Чумак (1963б), которая получила следующие данные о продолжительности всего времени генерации клеток и отдельных периодов цикла: $T \sim 72$ часа при $t_s = 8^1/_2 \pm 1$ час, $t_{G_2} \sim 4$ часа, $t_м = {}^3/_4$ часа и $t_{G_1} \sim 59$ час. Общая продолжительность митотического цикла эпителия роговицы в этих опытах оказалась такой же, как и в более ранних исследованиях Уткина (1958), выполненных на мышах с помощью облучения.

В литературе имеются также данные о длительности отдельных периодов митотического цикла эпителия роговицы. Кобург и др. (Koburg u. Schultze, 1961; Koburg u. Maurer, 1962) указывают на значительные колебания в продолжительности периода G_2 этой ткани у мышей (от 3,5 до 9 час.) при относительной стабильности периода синтеза ДНК ($t_s = 7—8$ час.). Столько же времени (7,7 часа) занимает синтез ДНК в митотическом цикле эпителия роговицы крыс (Pilgrim u. Maurer, 1962). По данным Веселкиной (1962), продолжительность периода G_2 в эпителии роговицы крыс составляет менее 4 час.

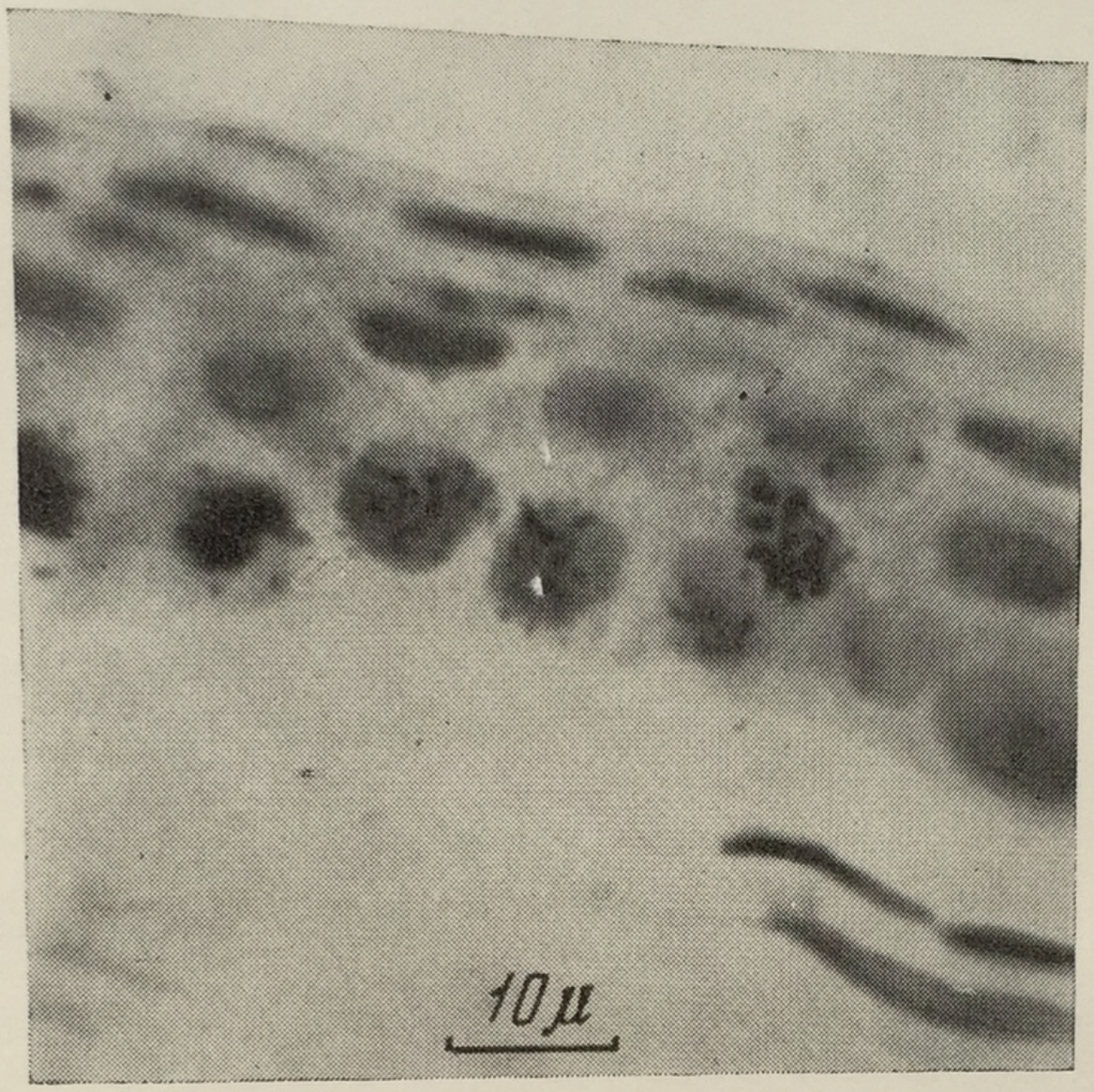
Вопрос о действии эстрогенов на митотический цикл эпителия роговицы исследованию не подвергался. Для изучения этого вопроса были использованы те же животные, на которых проводили исследование митотического цикла эпителия матки (см. предыдущий раздел). Автографы роговицы готовили по способу, описанному выше, экспозиция длилась 2 месяца; срезы окрашивали гематоксилином Майера. Один из автографов эпителия роговицы представлен на рис. 40. Отдельные методические приемы, использованные при постановке дополнительных опытов, будут описаны по ходу изложения результатов.

В самом начале исследования в эпителии роговицы, как и в эпителии матки, был определен митотический индекс. На рис. 41 видно, что введение эстрона вызывает увеличение числа митозов в эпителии роговицы в 1,4 раза ($P = 0{,}01$), что соответствует ранее полученным данным (см. гл. VII).

Далее предстояло выяснить, по каким путям осуществляется регуляция деления клеток при действии эстрона на эпителий роговицы, а именно: какие изменения в митотическом цикле приводят к увеличению митотического индекса ткани в 1,4 раза.

---

[2] См. Епифанова, 1964.



Автограф эпителия роговицы мыши через 6 часов после введения H^3-тимидина

Поперечный срез роговицы (4 μ), эмульсия «*М*», экспозиция 5 дней, окраска гематоксилином Майера.

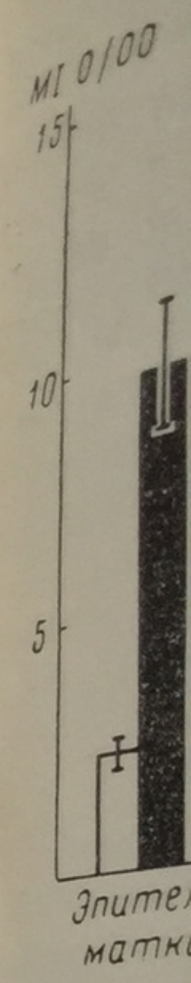


Рис. 41.
ческого
эпителии
эпителии
при д

Белые с
ч

На рис
жительнос
же сроках
мышей и
кина (1958
ляет в ог
60 час. Пр
ствии эст
гл. VII, р

Единст
цента меч
цы подоп
G_2 (первы
а в опыте
но сказат
явно не
лии рого
продолж
70 час.

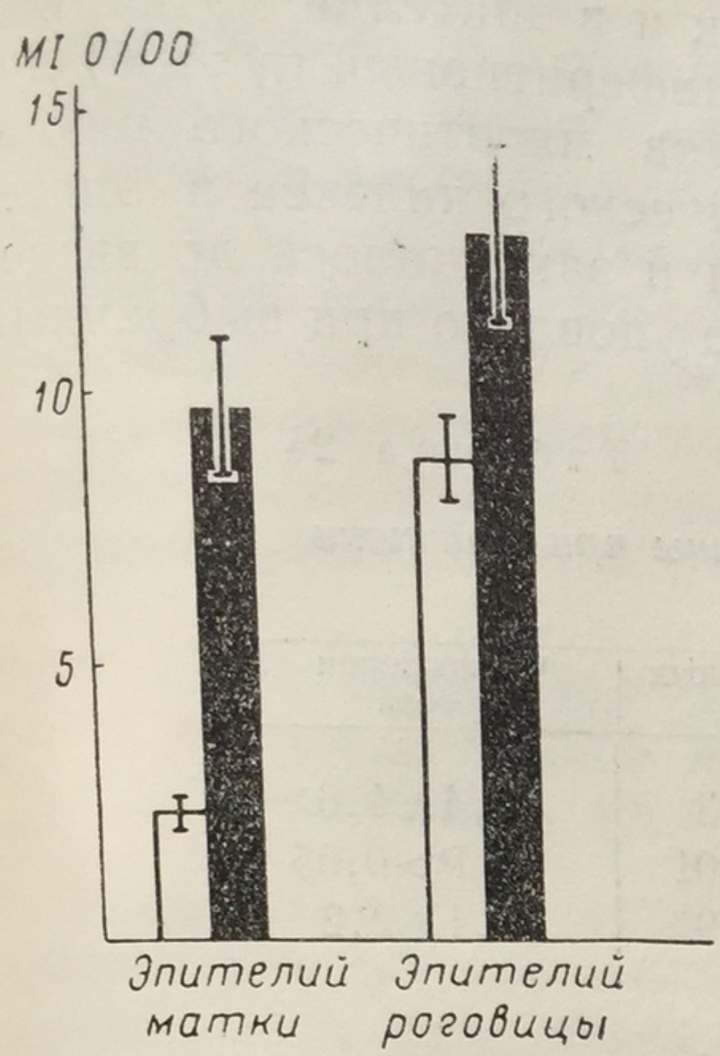


Рис. 41. Изменение митотического индекса (*MI*) в эпителии полости матки и эпителии роговицы у мышей при действии эстрона

Белые столбики — контроль, черные — опыт

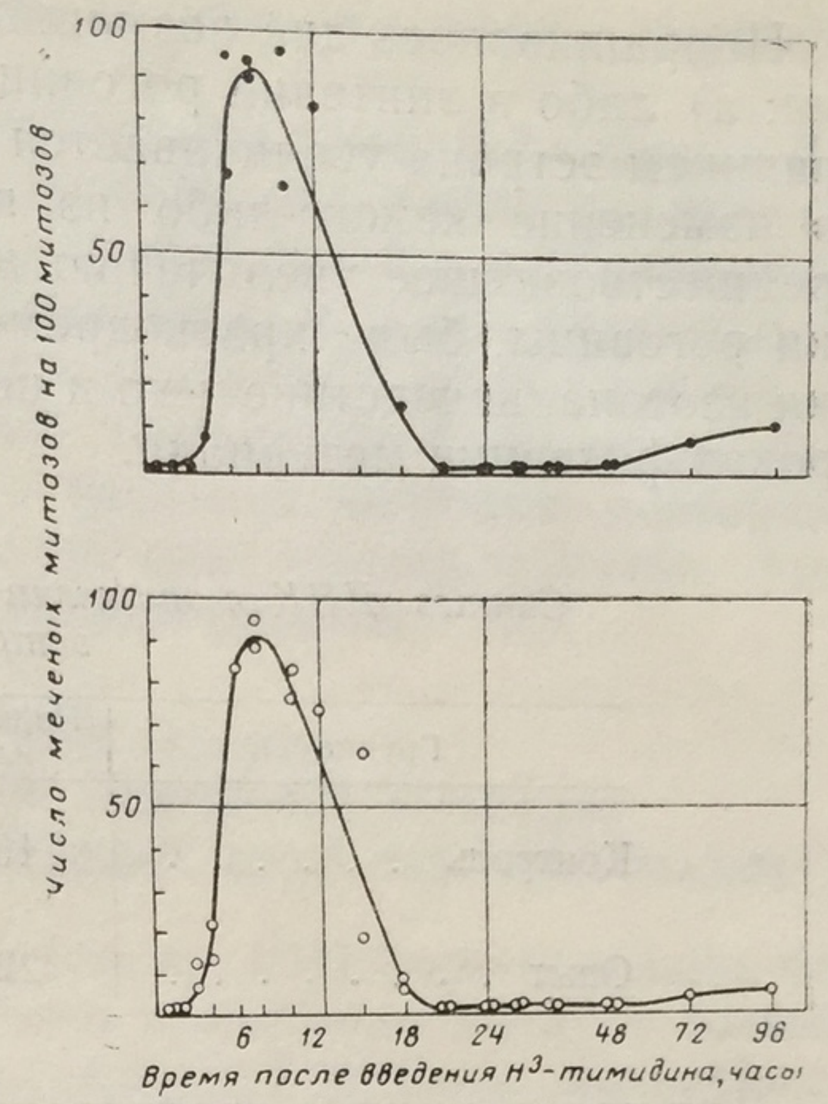


Рис. 42. Изменение числа меченых митозов в эпителии роговицы у мышей в различные сроки после введения H^3-тимидина

Верхний график — контроль, нижний — опыт. Каждый знак — данные по одному животному (среднее из 70—100 митозов в контроле и в опыте)

На рис. 42 видно, что в отличие от эпителия матки продолжительность митотического цикла в эпителии роговицы на тех же сроках исследования одинакова у контрольных и подопытных мышей и равна примерно 70 час., что совпадает с данными Утькина (1958) и Чумак (1963б). При этом время *S*-периода составляет в опыте и в контроле около 8 час., а периода G_1 около 60 час. Продолжительность митоза в эпителии роговицы при действии эстрона, как было показано в опытах с колхицином (см. гл. VII, раздел 8), также не меняется.

Единственным различием, улавливаемым по изменению процента меченых митозов, является сокращение в эпителии роговицы подопытных животных на 1 час продолжительности периода G_2 (первые меченые митозы появляются в контроле через 4 часа, а в опыте — через 3 часа после введения изотопа). Однако трудно сказать, насколько достоверно это различие, и к тому же оно явно не покрывает увеличения митотического индекса в эпителии роговицы под влиянием эстрона в 1,4 раза, учитывая, что продолжительность митотического цикла составляет не менее 70 час.

Напрашивалось два возможных объяснения этого несовпадения: а) либо в эпителии роговицы, как и в эпителии матки, под влиянием эстрона увеличивается «пролиферативный пул», б) либо изменение какого-либо из периодов митотического цикла, предшествовавшее увеличению митотического индекса в эпителии роговицы, было кратковременным и закончилось до введения изотопа, вследствие чего и не было уловлено при выбранных сроках фиксации материала.

Таблица 24

Синтез ДНК в эпителии роговицы при действии эстрона

Группа	Индекс меченых клеток, %	Число зерен серебра
Контроль	19,2±0,3	37,4±4,6
	P=0,01	P>0,05
Опыт	22,5±0,9	33,1±2,2

Для проверки этих предположений было поставлено два опыта (в этих опытах H^3-тимидин закапывали мышам в глаз).

Для определения пролиферативного пула в эпителии роговицы двум контрольным и двум подопытным мышам (последним сразу же после второй инъекции эстрона) вводили H^3-тимидин по тому же принципу, который был описан в разделе 1, а именно — через каждые 6 час. (интервал времени, более короткий, чем продолжительность S-периода) в течение 72 час. (время генерации клеток).

Подсчеты показали отсутствие различий в числе клеток, способных проходить митотический цикл, у контрольных (P_c = =93,2%) и подопытных (P_c =91,1%) животных.

Для исследования синтеза ДНК в эпителии роговицы пяти контрольным и семи подопытным мышам было произведено однократное введение H^3-тимидина через 10 час. после второй инъекции эстрона; через 6 час. после введения изотопа все животные были забиты.

Как следует из табл. 24, на данном сроке исследования (16 час. после введения эстрона) в эпителии роговицы подопытных животных наблюдается увеличение индекса меченых клеток по сравнению с контролем. Это говорит о том, что повышению митотического индекса, обнаруживаемому в эпителии роговицы через 24 часа после введения эстрона (см. рис. 41), предшествует изменение процесса синтеза ДНК.

Отсутствие различий в числе зерен серебра на меченую клетку в опыте и контроле (табл. 24) служит косвенным указанием на то, что в данном случае меняется не интенсивность самого синтеза, а ускоряется поступление клеток из периода G_1 в S-период,

следствием чего и является, по-видимому, увеличение митотического индекса ткани.

Таким образом, сопоставление результатов, полученных при изучении митотических циклов в эпителии матки и эпителии роговицы, позволило выявить ряд особенностей в действии эстрогенов на деление клеток в специфических и неспецифических по отношению к ним тканях. Однако прежде чем перейти к обсуждению установленных особенностей, необходимо рассмотреть данные радиоавтографического исследования действия повторных инъекций эстрона на митотический цикл эпителия матки. Этот материал будет изложен в следующем разделе.

4. РАДИОАВТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТОРМОЗЯЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПОВТОРНЫХ ИНЪЕКЦИЙ ЭСТРОГЕНА НА МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЭПИТЕЛИЯ МАТКИ[3]

В первой части исследования (см. гл. VII) было показано, что стимуляция митотического деления в эпителии матки у мышей наблюдается лишь после первых инъекций эстрона. Дальнейшее введение препарата (шесть и более инъекций) приводит к падению числа клеточных делений с последующим новым подъемом в случае прекращения инъекций гормона. Имеющиеся в литературе данные (гл. V) и собственные наблюдения (гл. VII, раздел 3) не позволяют поставить получаемый эффект в прямую зависимость от количества вводимого эстрона.

Сравнительная быстрота восстановления высокого уровня митотической активности в эпителии матки после прекращения воздействия гормоном первоначально давала основание предполагать, что блокирование происходит непосредственно перед вступлением клеток в митоз, то есть в премитотическом периоде G_2. Однако проведенное радиоавтографическое исследование продолжительности митотического цикла и его периодов в эпителии матки привело к необходимости пересмотреть это представление. Поскольку митотический цикл эпителия матки оказался значительно короче, чем можно было судить на основании опытов с колхицином (см. гл. VII, раздел 8), и длительность периода синтеза ДНК вместе с премитотическим периодом ($S+G_2$) не превышала нескольких часов, можно было думать, что снижение числа митозов в эпителии матки при повторных инъекциях эстрона является результатом задержки клеток на одном из более ранних этапов митотического цикла.

В соответствии с вышеизложенным были поставлены опыты для выяснения вопроса о том, какой из периодов митотического цикла эпителия матки наиболее чувствителен к тормозящему

[3] См. Епифанова, 1962б; Епифанова и Смоленская, 1962, 1963; Епифанова, 1964.

действию повторных инъекций эстрона. Опыты были проведены на мышах весом 20—25 *г*, кастрированных за 20 дней до начала опыта. Подопытным животным ежедневно производили однократную подкожную инъекцию 2,5 γ эстрона в 0,1 *мл* масла.

Мыши были разбиты на пять групп по три-четыре животных в каждой. Животным I группы вводили только масло; животным II, III и IV групп производили соответственно 2, 6 и 8 инъекций эстрона; в V группе после шести инъекций введение эстрона прекращали. Мышей I—IV групп забивали через сутки после по-

Таблица 25

Митотический индекс (MI), индекс меченых клеток (I), процент меченых митозов и среднее число зерен серебра на меченую клетку в эпителии матки через 4 часа после введения H^3*-тимидина мышам, подвергнутым действию эстрона*

Группа	Воздействие	*MI*, ‰	*I*, %	Число меченых митозов, %	Число зерен серебра на клетку
I	Контроль	0,2±0,02	0,8±0,1	100	22,5±4,5
II	2 инъекции эстрона . . .	28,0±7,9	4,7±1,2	99	21,2±1,5
III	6 инъекций эстрона . . .	9,3±3,3	3,3±1,1	97	22,0±1,1
IV	8 инъекций эстрона . . .	9,8±5,7	3,0±1,4	100	20,3±0,5
V	Прекращение введения эстрона после 6 инъекций	23,7±3,4	8,3±0,0	100	2,6±0,7

следней инъекции, V группы — на 3-й день после прекращения введения гормона. За 4 часа до забоя всем мышам вводили внутрибрюшинно по 15 μ*C* H^3-тимидина в 0,1 *мл* физиологического раствора.

По этой схеме в разное время было поставлено два опыта: один на мышах линии CBA, другой на беспородных мышах; использовали H^3-тимидин с удельной активностью: в первом опыте 2,5 *C/mM*, во втором 3 *C/mM*. Автографы матки готовили по методике, описанной в гл. VII.

Результаты опытов представлены в виде графиков, отражающих изменения ряда показателей в клетках эпителия матки в зависимости от применяемого воздействия (рис. 43 А — В). Рис. 43 А содержит данные первого опыта, носившего в известной мере предварительный характер; в этом опыте по техническим причинам не мог быть получен материал от животных IV группы (восемь инъекций эстрона). На рис. 43 Б, В изображены результаты второго опыта, поставленного на большем числе животных. Исходные значения средних величин, использованные при построении графиков на рис. 43 Б, В, приведены в табл. 25.

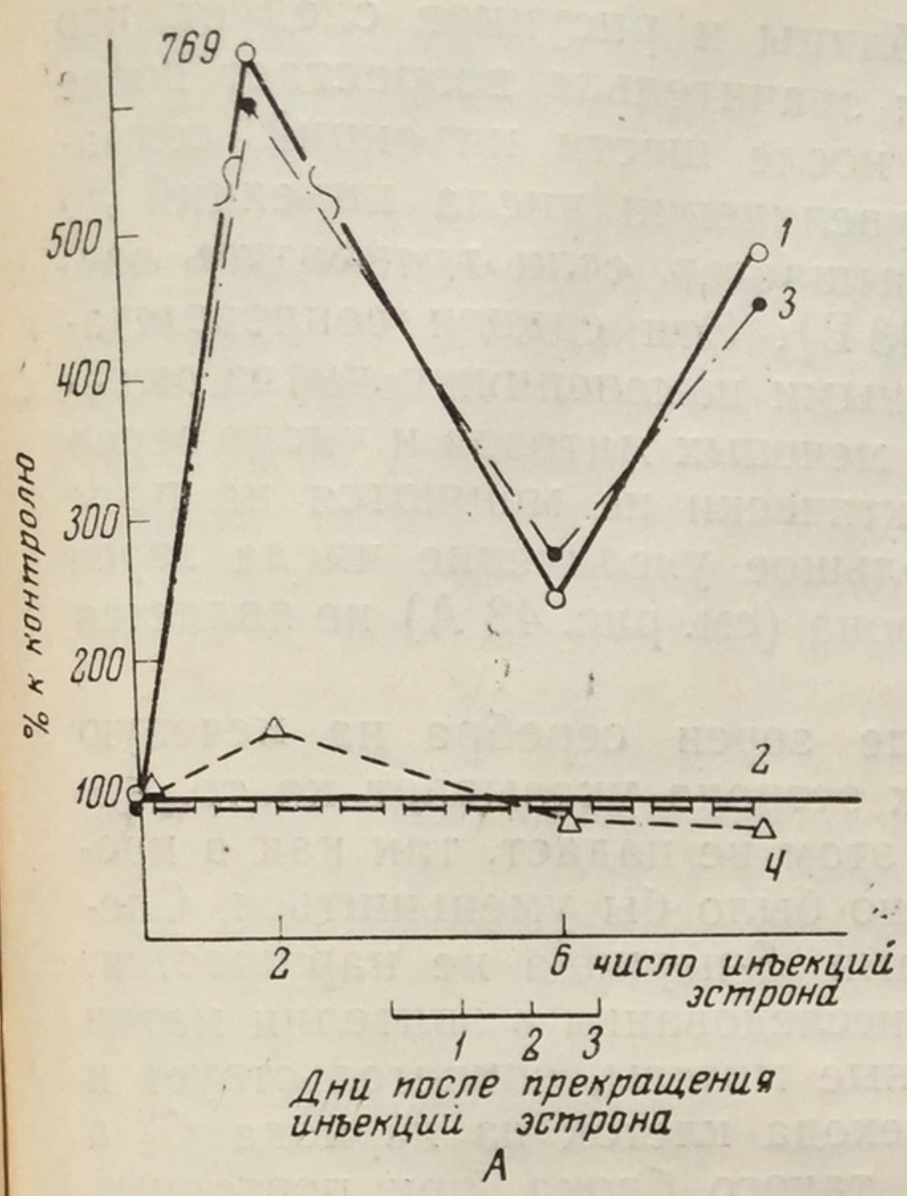
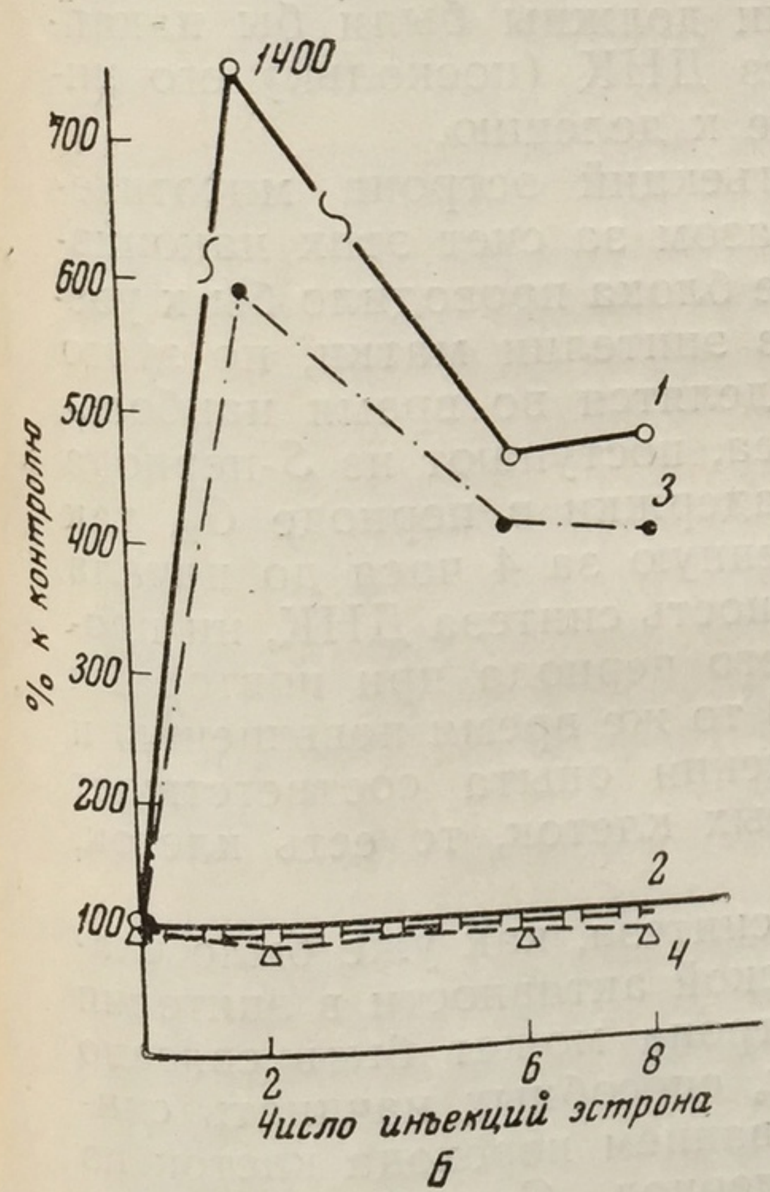
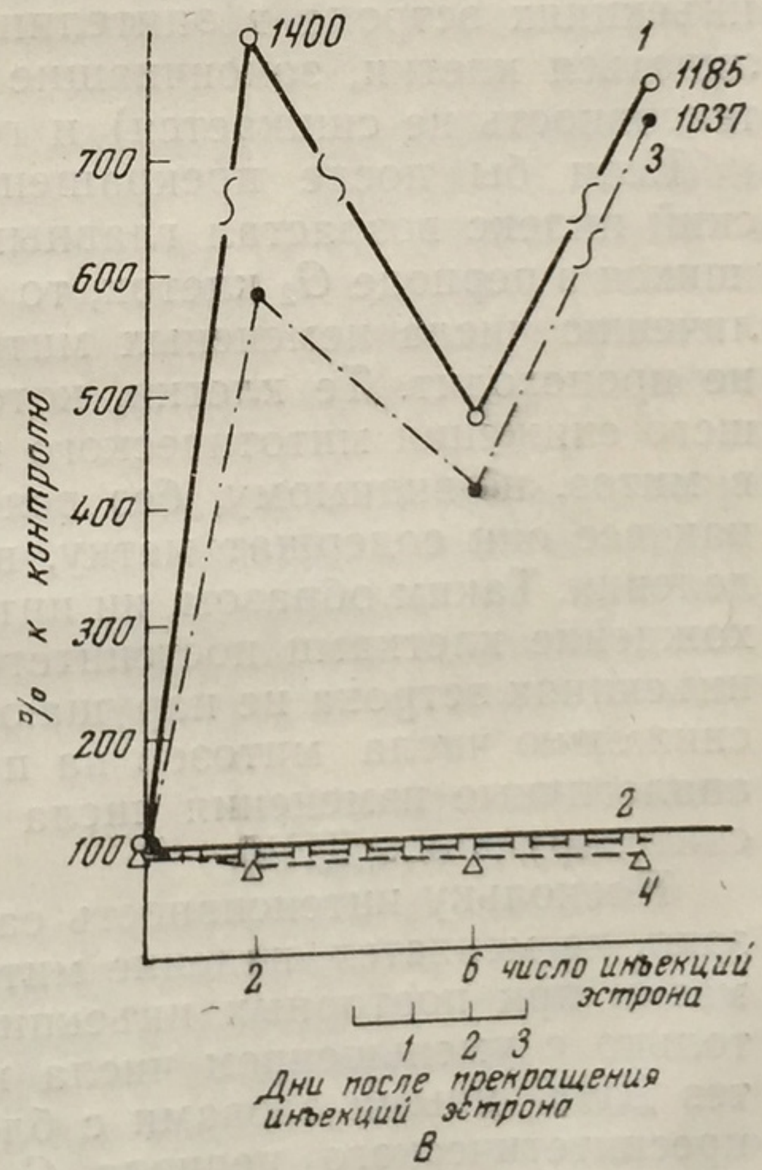


Рис. 43. Динамика митотического деления и синтеза ДНК в эпителии матки у мышей при повторных инъекциях эстрона

За 4 часа до забоя всем животным был введен H^3-тимидин

А — первый опыт, *Б*, *В* — второй опыт. *Б* — введение эстрона на всем протяжении опыта; *В* — прекращение введения эстрона после 6 инъекций; *1* — митотический индекс; *2* — число меченых митозов; *3* — индекс меченых клеток; *4* — число зерен серебра на клетку





Из рассмотрения данных таблицы и рисунков следует, что число митозов в эпителии матки значительно возрастает после двух инъекций эстрона, падает после шести инъекций, сохраняется на том же уровне при увеличении числа инъекций до восьми (рис. 43 Б), но вновь повышается, если прекратить введение препарата (рис. 43 А и 43 В). Эти сдвиги сопровождаются параллельными и аналогичными изменениями числа меченых клеток, в то время как число меченых митозов и число зерен серебра на меченую клетку практически не меняются на всем протяжении эксперимента. Небольшое увеличение числа зерен серебра после двух инъекций эстрона (см. рис. 43 А) не является достоверным.

Отсутствие изменений в числе зерен серебра на меченую клетку при повторных инъекциях эстрона указывает на то, что интенсивность синтеза ДНК при этом не падает, так как в противном случае число зерен должно было бы уменьшиться. Следовательно, прохождение клетками S-периода не нарушается.

Тот факт, что на всех сроках исследования в эпителии матки практически отсутствуют немеченые митозы, свидетельствует и об отсутствии блокирования перехода клеток из периода G_2 в митоз. В случае возникновения такого блока при повторных инъекциях эстрона в эпителии матки должны были бы накапливаться клетки, закончившие синтез ДНК (поскольку его интенсивность не снижается) и готовые к делению.

Если бы после прекращения инъекций эстрона митотический индекс возрастал главным образом за счет этих накопившихся в периоде G_2 клеток, то снятие блока проводило бы к увеличению числа немеченых митозов в эпителии матки, но этого не происходит. Те клетки, которые делятся во время наибольшего снижения митотического индекса, поступают из S-периода в митоз, по-видимому, без всякой задержки в периоде G_2, так как все они содержат метку, включенную за 4 часа до начала деления. Таким образом, ни интенсивность синтеза ДНК, ни прохождение клетками постсинтетического периода при повторных инъекциях эстрона не нарушаются. В то же время повышению и снижению числа митозов на протяжении опыта соответствуют аналогичные изменения числа меченых клеток, то есть клеток, синтезирующих ДНК.

Поскольку интенсивность самого синтеза, как уже было сказано, не меняется, падение митотической активности в эпителии матки при повторных инъекциях эстрона может быть связано только с уменьшением числа клеток, способных начинать синтез ДНК, иными словами с блокированием перехода клеток из пресинтетического периода G_1 в S-период. Следует отметить, что это блокирование является неполным (рис. 43 А и 43 В), так как часть клеток продолжает синтезировать ДНК, проходить период G_2 и вступать в митоз, в результате чего митотический

индекс не снижается до исходного уровня. Прекращение введения эстрона снимает блок $G_1 - S$, и число меченых клеток снова возрастает.

Полученные результаты находятся в соответствии с данными предыдущей главы, в которой было показано, что и стимуляция деления клеток в эпителии матки при двукратном введении эстрона связана, главным образом, с увеличением числа клеток, способных синтезировать ДНК, в то время как интенсивность самого синтеза и продолжительность периода G_2 не изменяются.

Вопрос о механизме тормозящего действия повторных инъекций эстрона на деление клеток остается неисследованным.

Эдгрен и Кэлхаун (Edgren a. Calhoun, 1959, 1961; Edgren, 1961) приводят большой фактический материал о тормозящем действии ряда стероидных гормонов, в том числе кортикостероидов, на рост матки у крыс и мышей при действии эстрогенов. Это позволило им высказать гипотезу о существовании в организме системы «эстрогенных буферов» стероидной природы. Однако убедительных экспериментальных данных в подтверждение этой гипотезы пока не получено.

Еще менее вероятна в условиях проведенных опытов возможность непосредственного превращения эстрона, представляющего собой активный эстроген, в неактивную форму, какой является, например, 17α-эстрадиол, подавляющий способность 17β-эстрадиола активировать трансгидрогеназу пиридиннуклеотидов в эндометрии (Villee, 1957, и др.; см. гл. VI). Как было показано другими исследователями (Erichsen a. Velle, 1960; Velle a. Erichsen, 1960; Breuer, 1962; Preedy, 1962, и др.), в эндометрии и во многих тканях эстрон превращается главным образом в 17β-эстрадиол и обратно, но ни тот, ни другой не превращаются в 17α-эстрадиол.

В свете представлений о способности клеток к авторегуляции наиболее вероятно предположить возможность прямого действия эстрогена на ряд механизмов, регулирующих по принципу обратной связи отдельные этапы образования предшественников ДНК. Этот вопрос будет рассмотрен в следующем разделе главы.

Из всего вышеизложенного следует, что угнетение деления клеток в эпителии матки у мышей при повторном введении эстрона вызвано блокированием способности клеток переходить к синтезу ДНК. Если же синтез ДНК уже начался, то он продолжается с обычной интенсивностью, и клетки беспрепятственно вступают в митоз. Это указывает на существование в митотическом цикле эпителия матки мыши критического периода, чувствительного к эстрону и предшествующего началу синтеза ДНК.

5. ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ НА ЭСТРОГЕН ТКАНИ-МИШЕНИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТКАНИ

Сопоставление данных радиоавтографического изучения митотических циклов и кинетики клеточных популяций в эпителии матки и эпителии роговицы у мышей при введении эстрона позволяет выявить ряд особенностей в действии эстрогенов на деление клеток в специфических и неспецифических по отношению к ним тканях.

Теоретически можно себе представить следующие варианты контроля митотического цикла, осуществляемые путем воздействий на его пусковые механизмы:

1. Увеличение или уменьшение пролиферативного пула клеточной популяции. Вызывается воздействиями, побуждающими клетки вступать в митотический цикл или выходить из него.

2. Сокращение или увеличение продолжительности митотического цикла, обусловленное воздействиями, вызывающими относительно равномерное ускорение или замедление прохождения клетками всех периодов цикла, в том числе самого митоза.

3. Увеличение продолжительности митотического цикла вследствие временной задержки (блокирования) клеток в каком-либо одном периоде (этапе) цикла, сопровождающееся вступлением в следующий период (этап) одновременно большого числа клеток после прекращения воздействия.

В опытах с изучением действия эстрона на деление клеток в эпителии матки и эпителии роговицы мышей проявились различные варианты контроля митотического цикла.

Действие эстрона на митотический цикл эпителия матки — ткани, специфически реагирующей на гормон, иллюстрирует рис. 44 (черные стрелки). В случае кратковременного действия эстрона в эпителии матки увеличивается пролиферативный пул, то есть число клеток, способных проходить митотический цикл (что подтверждает представления Суонна о глубоких метаболических сдвигах в тканях-мишенях под влиянием эстрогенов), и сокращается время прохождения клетками периодов S и G_1 (что ранее не было исследовано). Оба эти процесса полностью покрывают наблюдаемое увеличение митотического индекса ткани в результате эстрогенной стимуляции и, следовательно, могут считаться основными событиями в регуляции митотического цикла в выбранных условиях введения эстрона.

Полученные результаты показывают, что эстрогены вызывают глубокие перестройки в клетках эпителия матки, не влияя непосредственно на вступление клеток в деление и на ход самого митоза. В свете современных данных о механизме действия эстрогенов на клеточный метаболизм (Мюллер и др., см. гл. VI) такой ответ представляется вполне закономерным. В настоящее время установлено, что одной из первых реакций тканей-мишеней (и в том числе матки) на введение эстрогена является уси-

ление синтеза и-РНК и белкового синтеза, служащего «триггером» синтеза ДНК.

Как уже говорилось, на синхронизованной культуре HeLa в лаборатории Мюллера было показано (см. гл. II), что в пределах одного ядра ДНК может находиться в двух физиологических состояниях: 1) ДНК, способная к репликации (компетентная), и 2) ДНК, становящаяся способной к репликации при активировании белкового синтеза.

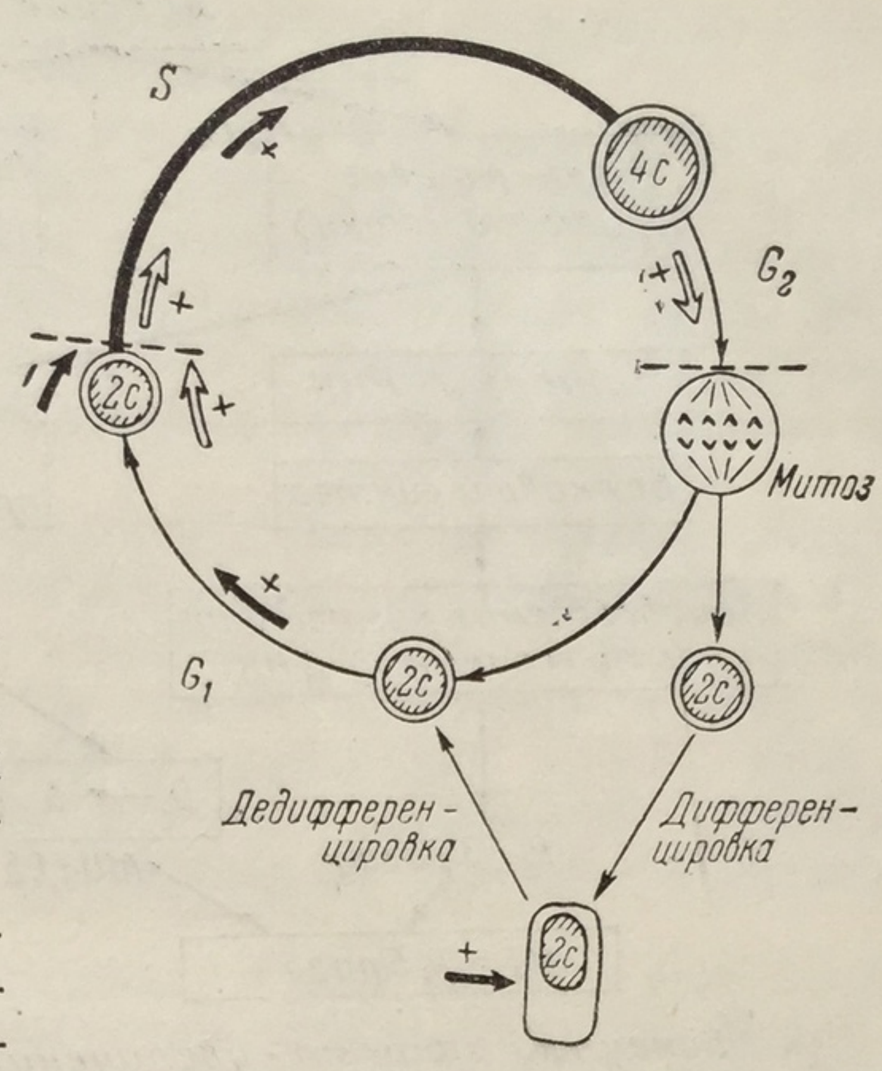


Рис. 44. Схема действия эстрона на митотический цикл эпителия матки (черные стрелки) и эпителия роговицы (белые стрелки); плюс означает стимулирующее, минус — тормозящее действие эстрона

2c — клетки с нормальным содержанием ДНК; *4c* — клетки с удвоенным содержанием ДНК

В свете этих данных может найти объяснение двоякий путь воздействия эстрогена на митотический цикл в эпителии матки: с одной стороны, ускорение прохождения клетками митотического цикла возможно, за счет более быстрого формирования предшественников; с другой — активирование «триггерного» фактора (белкового синтеза) и приобретение ДНК способности к репликации, то есть «команда» на перестройку всего типа обмена клеток эпителия матки для вступления в митотический цикл.

Согласно представлениям, развиваемым Вилли и Талалаем (см. гл. VI), эстрогены могут ускорять формирование предшественников ДНК, стимулируя перенос водорода в системе ДПН — ТПН и способствуя тем самым образованию богатых энергией соединений. С этой же точки зрения могут быть рассмотрены и данные о подавлении синтеза ДНК при повторных инъекциях эстрона (см. рис. 44).

В ряде работ (см. обзоры Канеллакиса — Canellakis, 1962 и Кафиани, 1963 а, б) показано существование механизмов, регулирующих по типу обратной связи отдельные звенья синтетических процессов от предшественников нуклеотидов до нуклеиновых кислот. Можно полагать, что повторное введение эстрона приводит в действие один из таких механизмов, что и проявляется в блокировании способности клеток начинать синтез ДНК.

Так, например, восстановленный при участии эстрогенов ТПН способствует ферментативному восстановлению рибозы до де-

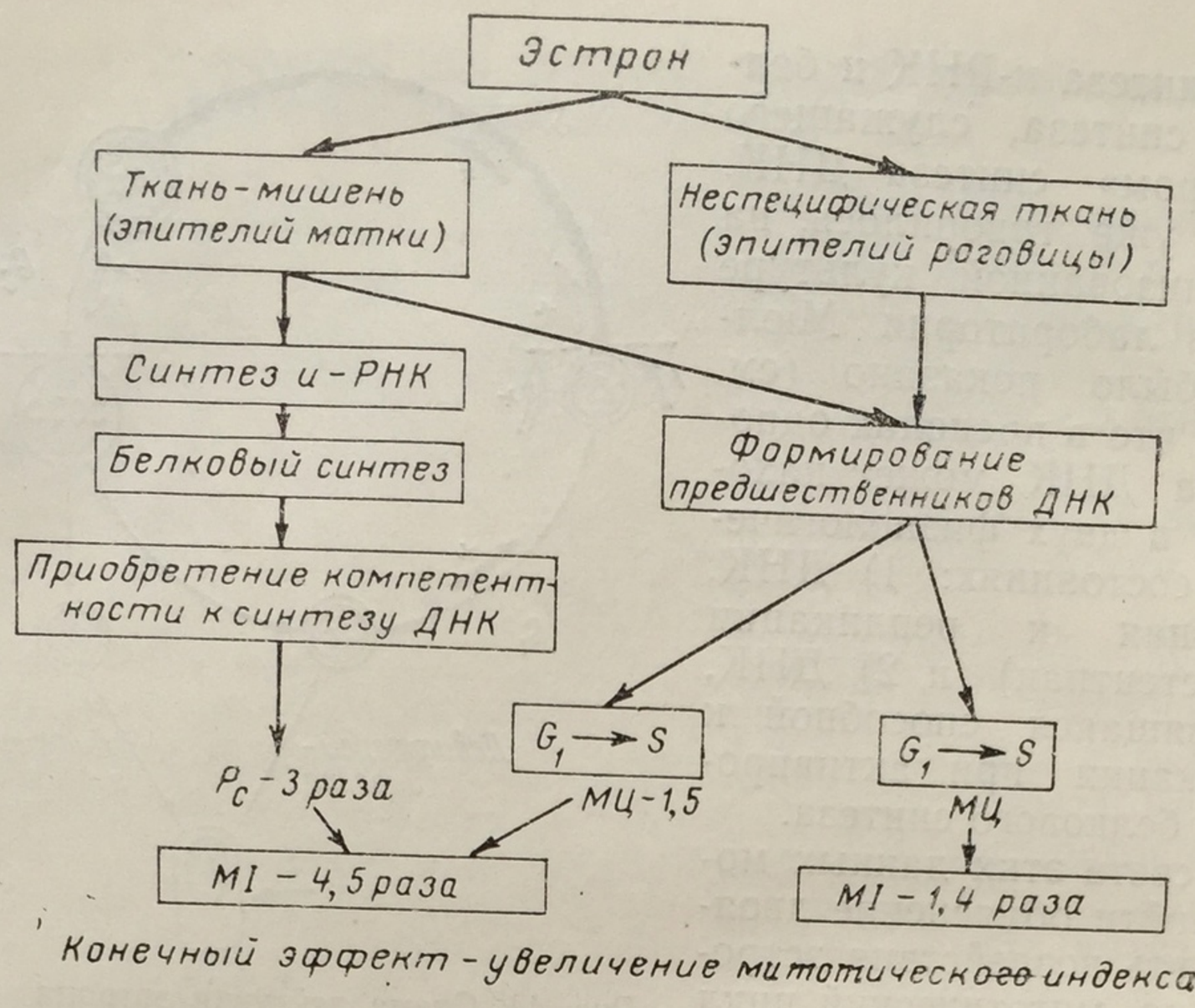


Рис. 45. Предполагаемые пути воздействия эстрона на деление клеток в ткани-мишени и неспецифической ткани

P_c — пролиферативный пул, *МЦ* — митотический цикл, *MI* — митотический индекс

зоксирибозы на уровне дифосфатов, пополняя фонд предшественников ДНК; однако эта реакция подавляется трифосфатами некоторых дезоксирибонуклеозидов, и синтез ДНК останавливается (Ives et al., 1963). Не случайно поэтому при повторном введении эстрона подавляются процессы, протекающие в пресинтетическом, а не в премитотическом периоде, как предполагалось раньше.

Рис. 44 (белые стрелки) показывает также действие эстрона на митотический цикл эпителия роговицы — ткани, не являющейся специфической в отношении гормона. В случае кратковременного действия эстрона в эпителии роговицы мышей имеет место сокращение продолжительности премитотического периода G_2 на $^1/_4$ часть времени этого периода.

На первый взгляд может показаться, что это подтверждает точку зрения Буллоу, разделяемую и Суонном, о действии эстрогенов на неспецифические ткани (энергетический стимул перед митозом). Однако это сокращение настолько незначительно, что оно не может служить причиной повышения митотического индекса, которое происходит, по-видимому, главным образом за счет ускорения перехода клеток к синтезу ДНК благодаря более быстрому формированию предшественников (переход $G_1 - S$).

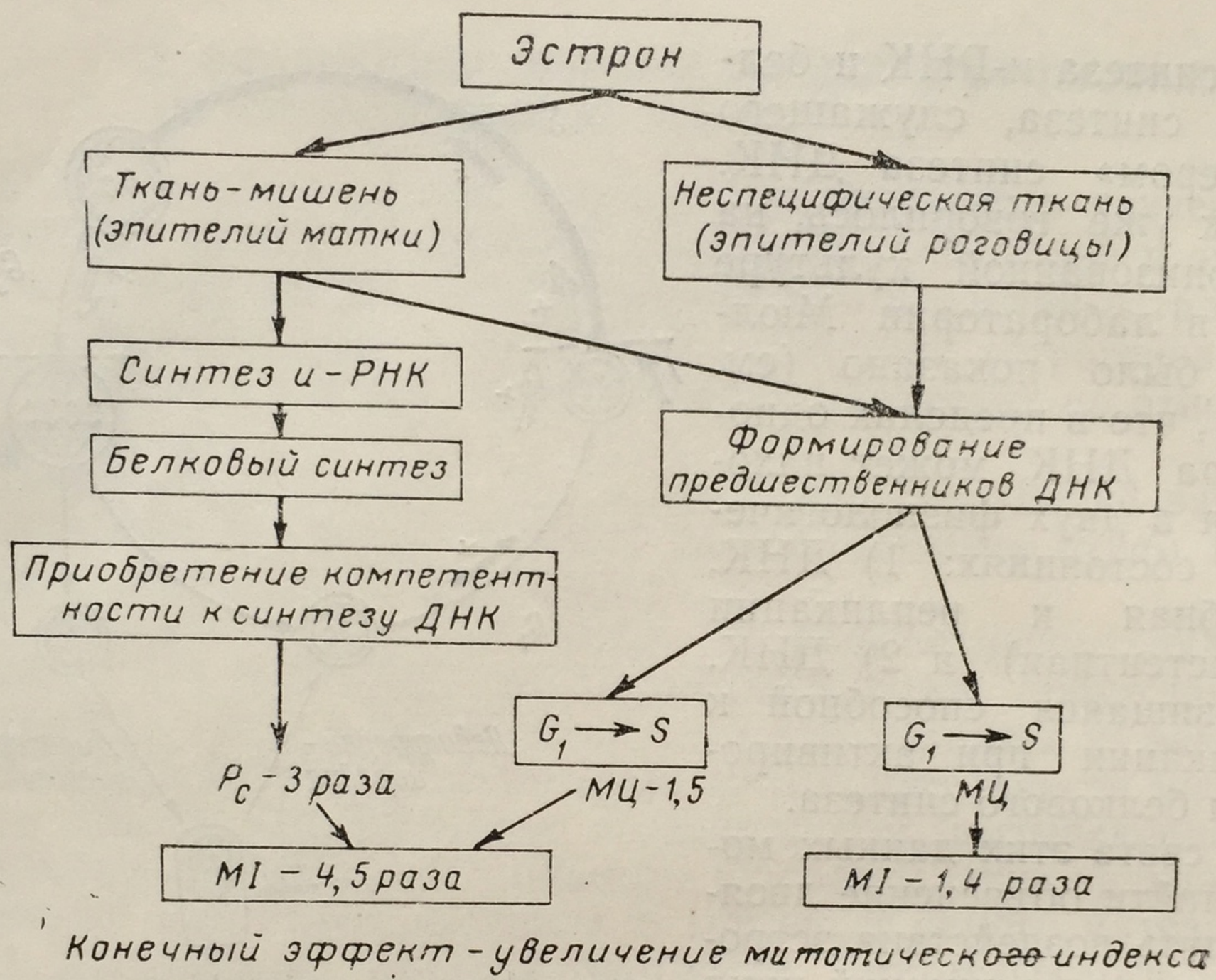


Рис. 45. Предполагаемые пути воздействия эстрона на деление клеток в ткани-мишени и неспецифической ткани

P_c — пролиферативный пул, *МЦ* — митотический цикл, *MI* — митотический индекс

зоксирибозы на уровне дифосфатов, пополняя фонд предшественников ДНК; однако эта реакция подавляется трифосфатами некоторых дезоксирибонуклеозидов, и синтез ДНК останавливается (Ives et al., 1963). Не случайно поэтому при повторном введении эстрона подавляются процессы, протекающие в пресинтетическом, а не в премитотическом периоде, как предполагалось раньше.

Рис. 44 (белые стрелки) показывает также действие эстрона на митотический цикл эпителия роговицы — ткани, не являющейся специфической в отношении гормона. В случае кратковременного действия эстрона в эпителии роговицы мышей имеет место сокращение продолжительности премитотического периода G_2 на $^1/_4$ часть времени этого периода.

На первый взгляд может показаться, что это подтверждает точку зрения Буллоу, разделяемую и Суонном, о действии эстрогенов на неспецифические ткани (энергетический стимул перед митозом). Однако это сокращение настолько незначительно, что

Следовательно, и в эпителии роговицы эстрон затрагивает в основном процессы, связанные с синтезом ДНК.

Тем не менее существенным отличием действия эстрона на эпителий роговицы по сравнению с действием на эпителий матки является отсутствие изменений в пролиферативном пуле, то есть в числе клеток, способных проходить митотический цикл. Это может служить указанием на то, что в данном случае эстрон влияет лишь на ДНК, находящуюся в состоянии готовности к биосинтезу.

Предполагаемые пути воздействия эстрона на деление клеток в ткани-мишени и неспецифической ткани показаны на рис. 45.

Рассмотренный материал позволяет думать, что в ткани, специфически реагирующей на эстрон (эпителий матки), и неспецифической ткани (эпителий роговицы) может существовать общая система, чувствительная к данному гормону (предположительно этапы формирования предшественников ДНК).

Наряду с этим в специфических тканях имеется еще одна система, чувствительная к эстрогенам, которая пока не обнаружена в неспецифических тканях (предположительно этапы синтеза и-РНК и белкового синтеза, идущего с участием растворимых РНК). По-видимому, белки (белок), образование которых начинается после введения эстрогенов, имеют прямое отношение к системам регуляции, включающим синтез ДНК.

Существование перечисленных путей контроля митотического цикла не исключает возможного действия эстрогенов на другие звенья обмена, которые могут быть выявлены в различных условиях опыта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подведем некоторые итоги рассмотренному в настоящей книге литературному и собственному экспериментальному материалу. Как мы видели, существуют две основные точки зрения по вопросу о путях воздействия эстрогенов на деление клеток в тканях сформированного организма. Согласно одной из них (W. S. Bullough, 1952c, 1955, и др.), эстрогены действуют как энергетические стимуляторы деления непосредственно перед вступлением клеток в митоз. Другая концепция (Swann, 1958) предполагает, что наряду с этим в некоторых тканях эстрогены способны вызывать индуктивное переключение всего типа метаболизма клеток на синтез нуклеиновых кислот и белков, необходимых для построения митотического аппарата. В отличие от Буллоу, Суонн признает существование качественных особенностей в действии эстрогенов на разные типы тканей. Строгие экспериментальные доказательства в пользу каждого из этих представлений отсутствуют.

Для правильной оценки различий в характере действия эстрогена на размножение клеток удобнее всего сравнивать между собой ткани, различающиеся по специфичности реакции на данный гормон. Органы и ткани, специфически отвечающие на введение эстрогенов суммой реакций, приводящих к их росту, получили название органов-мишеней и тканей-мишеней. Более точные критерии специфичности реакции ткани на эстроген отсутствуют, и, следовательно, понятие ткани-мишени по отношению к данной группе гормонов нуждается в дальнейшей экспериментальной расшифровке.

В последнее время значительные успехи достигнуты в идентификации первичных звеньев внутриклеточного метаболизма органов-мишеней, подвергающихся действию эстрогенов. Были получены новые факты, которые привели к представлению об активации эстрогенами генетического аппарата клетки путем связывания репрессора. Однако результаты этих работ не позволяют судить о том, каким образом первоначальная активация гена гормоном приводит в действие всю цепь событий, завершающихся митозом. Совсем неизученными в этом плане явля-

ются пути воздействия эстрогенов на первичные звенья метаболизма тех неспецифических органов и тканей, в которых они вызывают изменения митотического режима.

Ответить на поставленные вопросы можно только путем выявления точек приложения действия эстрогенов в митотическом цикле тканей, то есть на всем протяжении подготовки клеток к делению. Подобного рода данные в литературе отсутствуют.

Нами было проведено сравнительное изучение действия эстрогенов на митотический режим и прохождение клетками митотического цикла в тканях, различающихся по специфичности реакции на гормон.

Постановка задачи обусловила два основных этапа в исследовании:

1) изучение митотического режима ткани-мишени и неспецифической (контрольной) ткани в условиях нормального и нарушенного баланса эстрогенов в организме;

2) анализ митотического цикла и кинетики клеточных популяций сопоставляемых тканей при действии эстрогенов.

Исследование было начато с изучения митотического режима эпителия матки и эпителия роговицы на протяжении эстрального цикла мыши. Было показано, что митотическая активность эпителия матки неодинакова на разных стадиях эстрального цикла и выражается двухвершинной кривой с максимумом клеточных делений в проэструсе и в начале диэструса. Первый подъем числа делящихся клеток совпадает во времени с интенсивным разрастанием эпителия матки в проэструсе, второй — с процессом регенерации эпителия. В эпителии роговицы аналогичные колебания митотической активности отсутствуют.

Вполне правомерно было объяснить первый подъем митотической активности эпителия матки в проэструсе повышением концентрации эстрогенов в крови. Однако оставалось нясным, что является причиной быстрого снижения митотической активности эпителия при переходе от проэструса к эструсу, когда содержание эстрогенов в крови еще продолжает нарастать, или же увеличения числа митозов в метаэструсе — диэструсе при одновременном снижении концентрации эстрогенов в крови.

Известно, что в конце эструса имеет место овуляция с последующим образованием желтых тел. Поэтому казалось логичным связать второй подъем митотической активности эпителия с функцией развивающегося желтого тела.

В связи с этим было проведено исследование митотического режима эпителия матки у мышей на ранних сроках беременности, когда происходит естественная активация желтых тел. Оказалось, что на вторые и третьи сутки беременности митотический индекс в эпителии матки не выше, чем у небеременных мышей при переходе от эструса к метаэструсу, то есть в те же сроки после овуляции, а на пятые сутки беременности он сни-

жается до нуля. Таким образом, активация желтых тел после спаривания не способствовала повышению митотической активности эпителия матки у мышей, и причины второго подъема числа митозов во время эстрального цикла оставались невыясненными.

С целью дальнейшего анализа вопроса была предпринята попытка создания такой экспериментальной модели, которая бы в известной мере отражала митотический режим эпителия матки в процессе эстрального цикла. Организм кастрированной мыши насыщали в течение некоторого времени эстроном (путем повторных инъекций), а затем прекращали его введение, имитируя таким образом сдвиги в содержании эстрогенов в крови нормально циклирующих мышей.

Было обнаружено, что только первые две — четыре инъекции эстрона стимулируют деление клеток в эпителии матки. При увеличении количества инъекций эстрона до шести и более происходило снижение митотической активности, которое сменялось новым подъемом числа делящихся клеток в случае прекращения введения препарата; этот подъем можно было обнаружить на третий — пятый день после прекращения инъекций гормона.

В противоположность этому прекращение введения эстрона в период максимальной митотической активности эпителия матки после двух инъекций вызвало на третий день снижение числа митозов в ткани с последующим повышением на пятый день.

Полученные результаты свидетельствовали о регуляционном характере сдвигов в митотическом режиме эпителия матки при повторном введении мышам эстрона и после прекращения воздействия. Регуляционный характер наблюдаемых изменений митотической активности был подтвержден и в опытах с однократным введением мышам большой дозы эстрона, которая также вызывала значительное увеличение митотического индекса в эпителии матки. Это показало, что торможение митотической активности после шести повторных инъекций эстрона не является результатом абсолютного увеличения содержания гормона в организме. Прежде чем исследовать вопрос о причинах развивающегося торможения митотической активности, важно было выяснить, какие факторы участвуют в регуляции этого феномена и насколько глубоким оказывается наблюдаемое подавление клеточного деления.

В первую очередь было исследовано действие гормона желтого тела — прогестерона. Оказалось, что ежедневное введение мышам прогестерона (пять инъекций) вызывает многократное увеличение числа делящихся клеток в эпителии матки. Однако в условиях 5-дневного введения прогестерона после шести предварительных инъекций эстрона митотический индекс оставался низким. Отсюда был сделан вывод, что прогестерон не является тем фактором, отсутствие которого может влиять на торможение

митотической активности эпителия матки при повторном введении эстрона кастрированным животным.

Эти данные в соответствии с результатами опытов по активации желтых тел у мышей после спаривания свидетельствовали также против участия прогестерона в регуляции митотического режима эпителия матки на протяжении эстрального цикла. Попытки повлиять на характер сдвигов митотической активности эпителия матки при повторных инъекциях эстрона и после их прекращения введением некоторых других стимуляторов клеточного деления (фолиевая кислота, АТФ) также оказались безуспешными, что указывало на большую устойчивость наблюдаемых изменений (феномен торможения и последующего подъема митотической активности).

Установив особенности митотического режима ткани-мишени в различных условиях воздействия эстрогенами, можно было перейти к основной задаче исследования — сравнительному изучению регулирующего влияния эстрогенов на митотический режим ткани-мишени и контрольной ткани. Первые же опыты показали, что две инъекции эстрона вызывают многократное увеличение числа митозов в эпителии матки у мышей и оказывают менее значительное, но отчетливое стимулирующее действие на митотическую активность эпителия роговицы тех же животных. Таким образом, выбранные условия проведения опытов позволяли одновременно получать эстрогенную стимуляцию деления клеток в эпителии матки и в эпителии роговицы у одного и того же животного, что давало возможность проводить параллельный анализ особенностей реакции на эстроген каждой из исследуемых тканей. Для анализа причин наблюдаемых различий в реакции на эстроген в обеих тканях с помощью колхицинового метода была определена продолжительность митоза и интерфазы до и после воздействия гормоном. Оказалось, что введение эстрона не изменяет продолжительности митоза ни в эпителии матки, ни в эпителии роговицы у мышей, в то время как продолжительность интерфазы каждой ткани сокращается пропорционально увеличению митотического индекса.

Значительные различия в сокращении времени интерфазы эпителия матки и эпителия роговицы при действии эстрона позволяли думать, что стимуляция деления клеток в исследуемых тканях связана с изменением различных периодов их интерфаз, то есть с неоднозначными по своей природе процессами (что согласуется с представлениями Суонна). Однако полученный материал не давал определенного ответа на поставленный вопрос, так как неизвестно было, на какие именно периоды интерфазы действует эстрон в митотическом цикле каждой из исследуемых тканей.

Следующим шагом явились опыты по выяснению влияния эстрона на деление клеток в эпителии матки и эпителии рогови-

цы в условиях инкубации. В случае справедливости предположения Буллоу об универсальном характере действия эстрогенов как энергетических стимуляторов митоза можно было ожидать, что обе ткани (и ткань-мишень, и контрольная ткань) при кратковременной инкубации с эстрогеном будут реагировать на гормон увеличением числа митозов. Однако, в отличие от результатов опытов in vivo, в условиях 5-часовой инкубации органов по Буллоу с добавлением в среду эстрогена в эпителии матки наблюдалось лишь незначительное увеличение митотического индекса, а число клеточных делений в эпителии роговицы снижалось. Таким образом, данные, полученные в опытах с инкубацией, свидетельствовали против предположения Буллоу об универсальном характере действия эстрогенов как энергетических стимуляторов деления клеток.

После того как был охарактеризован митотический режим и получены предварительные сведения о точках приложения действия эстрона в ткани-мишени и неспецифической ткани, можно было перейти ко второй части исследований, содержанием которой явилось радиоавтографическое изучение митотических циклов и кинетики клеточных популяций сопоставляемых тканей при действии эстрона.

Прежде всего был определен митотический индекс в эпителии матки и эпителии роговицы. Было показано (в соответствии с результатами первых опытов), что эстрон вызывает достоверное увеличение числа митозов как в той, так и в другой ткани, но в эпителии матки — в 4,5 раза, а в эпителии роговицы — в 1,4 раза. Далее было исследовано действие эстрона на митотический цикл обеих тканей. Было установлено, что продолжительность митотического цикла в эпителии матки сокращается после введения эстрона в 1,5 раза главным образом за счет ускоренного поступления клеток из пресинтетического периода G_1 в период синтеза ДНК (S-период). Аналогичная картина наблюдалась и в эпителии роговицы.

Как показали расчеты, сокращение митотического цикла в эпителии роговицы при постоянном времени митоза вполне могло обеспечить прирост числа делящихся клеток в 1,4 раза. Однако сокращение в 1,5 раза длительности митотического цикла в эпителии матки явно не покрывало наблюдаемого четырехкратного увеличения митотического индекса этой ткани. Отсюда следовало, что действие эстрона на ткань-мишень не ограничивается ускорением прохождения клетками митотического цикла.

Для дальнейшего анализа вопроса в обеих исследуемых тканях был определен процент клеток, способных синтезировать ДНК, иначе говоря, пролиферативный пул ткани. Оказалось, что введение эстрона в 3 раза увеличивает пролиферативный пул в эпителии матки, в то время как в эпителии роговицы он остается без изменений.

Таким образом, сопоставление результатов радиоавтографического исследования митотических циклов и кинетики клеточных популяций эпителия матки и эпителия роговицы позволило выявить принципиальные различия в характере действия эстрона на ткань-мишень и неспецифическую ткань, связанные с особенностями их метаболизма: и в той, и в другой ткани гормон ускорял прохождение клетками митотического цикла, но в ткани-мишени увеличивал кроме того, еще в 3 раза число клеток, способных синтезировать ДНК и проходить цикл, следствием чего и являлось повышение митотического индекса этой ткани в 4,5 раза.

В итоге исследования было установлено, что под влиянием эстрона в ткани-мишени (эпителий матки) происходит как увеличение числа клеток, способных проходить митотический цикл (что подтверждает точку зрения Суонна), так и сокращение времени прохождения клетками цикла (что ранее не было исследовано). Оба эти процесса полностью покрывают наблюдаемое увеличение митотического индекса в результате гормональной стимуляции и, следовательно, могут считаться основными событиями в регуляции митотического цикла ткани-мишени при использованной дозе эстрона. Полученные результаты показали, что эстрон вызывает глубокие перестройки в клетках эпителия матки, не влияя в то же время на переход клеток из премитотического периода в митоз и на ход уже начавшегося деления.

В неспецифической ткани (эпителий роговицы) эстрон также затрагивает в основном процессы, связанные с синтезом ДНК, свидетельствуя тем самым против предположения Буллоу об эстрогенах как стимуляторах, действующих в премитотическом периоде. Тем не менее существенным отличием действия эстрона на эпителий роговицы по сравнению с действием на эпителий матки является отсутствие изменений в числе клеток, способных проходить митотический цикл.

Эти результаты, полученные методом радиоавтографии, хорошо согласуются с данными биохимических исследований последнего времени, в которых было показано, что первичное действие эстрогенов в тканях-мишенях направлено на усиление синтеза информационной РНК в клетках с последующим усилением в них белкового синтеза и приобретением готовности к синтезу ДНК. Можно полагать, что в наших опытах это проявилось в увеличении пролиферативного пула ткани-мишени. Что касается ткани, не являющейся специфической по отношению к эстрону, то в данном случае последний влияет, по-видимому, лишь на клетки, находящиеся в состоянии готовности к синтезу ДНК.

Представленный материал позволяет думать, что в ткани, специфически реагирующей на эстрон (эпителий матки), и в неспецифической ткани (эпителий роговицы) может существовать общая система, чувствительная к данному гормону (предпо-

ложительно этапы формирования предшественников ДНК). Воздействие на эту систему приводит к ускорению прохождения клетками митотического цикла. Наряду с этим в специфических тканях имеется еще одна система, чувствительная к эстрогенам, которая пока не обнаружена в неспецифических тканях (предположительно этапы синтеза и-РНК и белкового синтеза). По-видимому, белки (или белок), образование которых начинается после введения эстрогенов, имеют прямое отношение к механизмам регуляции синтеза ДНК. Воздействие эстрогенов на эту систему побуждает клетки вступать в митотический цикл.

Резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что отличительной особенностью органа- и ткани-мишени в реакции на эстроген является наличие в них эстрогеночувствительной системы, обеспечивающей в ходе реакций приобретение новыми клетками способности к прохождению митотического цикла и синтезу ДНК, что в конечном итоге приводит к росту ткани (органа).

В настоящем исследовании невыясненным оставался вопрос о причинах падения митотической активности эпителия матки при повторном введении эстрона, сменяющегося новым подъемом числа делящихся клеток в случае прекращения инъекций гормона. Радиоавтографический анализ этого процесса показал, что угнетение деления клеток при продолжающемся введении эстрона вызвано главным образом блокированием способности клеток переходить из пресинтетического периода в период синтеза ДНК (блок G_1—S) с последующим одновременным вступлением в синтез большого числа клеток после прекращения воздействия. При этом прохождение клетками премитотического периода не нарушается, и они беспрепятственно вступают в митоз. Таким образом, в случае тормозящего действия повторных инъекций эстрона на деление клеток эпителия матки (как и в условиях эстрогенной стимуляции) в митотическом цикле затрагиваются не заключительные этапы интеркинеза и не сам митоз, а процессы, предшествующие синтезу ДНК. Этот факт свидетельствует против того, что в феномене развивающегося торможения митотической активности эпителия матки могут принимать непосредственное участие быстро действующие премитотические ингибиторы (типа адреналина и т. п.).

Устойчивость наблюдаемых сдвигов митотической активности эпителия матки (торможение при повторном введении эстрона и последующий подъем после прекращения инъекций) к влиянию различных факторов и очевидная общность точек приложения действия эстрона в митотическом цикле ткани в условиях стимуляции и торможения митозов позволяют предполагать существование в эпителии матки собственного гомеостатического механизма, способного регулировать митотический режим (подобно тому, как это было показано, например, для печени). В пользу этого свидетельствуют также данные о возможности

влияния эстрогенов на механизмы, регулирующие образование предшественников ДНК по типу обратной связи.

Радиоавтографический анализ действия эстрона как стимулятора клеточного размножения позволил в рамках настоящего исследования выявить различные варианты контроля митотического цикла.

Так, в случае кратковременного действия эстрона на ткань-мишень возрастало число клеток, способных проходить митотический цикл, то есть увеличивался пролиферативный пул ткани. Кроме того, при кратковременном действии эстрона как на ткань-мишень, так и на контрольную ткань имело место ускорение прохождения клетками митотического цикла. Наконец, в условиях повторного действия эстрона на ткань-мишень можно было наблюдать возникновение в митотическом цикле блока, препятствовавшего переходу клеток из пресинтетического периода в период синтеза ДНК.

То обстоятельство, что в клетках эпителия матки, которые к моменту введения эстрона уже начинали синтез ДНК, последний продолжался с обычной интенсивностью, указывало на существование в митотическом цикле определенного этапа повышенной чувствительности к эстрону, пройдя который клетки переставали реагировать на гормон. Таким образом, применение эстрона в качестве анализатора позволило идентифицировать в митотическом цикле эпителия матки критический период и «пункт необратимости» (по Мэзия).

Согласно современным представлениям, направленность событий на протяжении митотического цикла определяется последовательной активацией одних генов и репрессией других, что и приводит к возникновению критических периодов (состояний), во время которых происходит смена типов синтеза специфических макромолекул, необходимых для синтеза и редупликации ДНК, нормального прохождения клетками митотического цикла и вступления их в митоз. При этом активаторами генов (индукторами) могут служить различные факторы, в том числе и гормоны. В настоящем исследовании эстрон являлся, по-видимому, такого рода индуктором.

Представления о наличии и биологическом значении критических периодов в митотическом цикле сформированных клеток во многих отношениях сближаются с существующими взглядами на природу критических периодов в эмбриональном развитии организмов, также отличающихся повышенной чувствительностью к воздействиям. Это позволяет предполагать, что подобный принцип регуляции, состоящий в периодическом возникновении критических состояний в результате последовательной активации отдельных генов, распространяется не только на события митотического цикла, но и на более широкий круг явлений, создавая возможность оптимального функционирования различных биологических систем.

ЛИТЕРАТУРА

Александров В. Я. Цитология, 1962, **4**, 1, 2—17.
Алешин Б. В. Успехи соврем. биол., 1959, **47**, 1, 80—99.
Алов И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1955а, **40**, 11, 63—65.
Алов И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1955б, **40**, 12, 47—50.
Алов И. А. Докл. АН СССР, 1956, **107**, 5, 745—747.
Алов И. А. Труды Хабаровск. мед. ин-та, 1957а, сб. 15, 31—43.
Алов И. А. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1957б, **34**, 6, 75—79.
Алов И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959, **48**, 11, 107—112.
Алов И. А. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960, 6—7.
Алов И. А. Цитология, 1962а, **4**, 3, 297—305.
Алов И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962б, **54**, 9, 87—91.
Алов И. А. Очерки физиологии митотического деления клеток. М., 1964.
Алов И. А. и Красильникова Н. В. Докл. АН СССР, 1962, **142**, 4, 933—935.
Алов И. А., Павленко Г. Я. и Сухинина М. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1955, **39**, 4, 63—65.
Альтман А. Д. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1945, **20**, 10—11 (4—5), 47—51.
Артемьева Н. С., Бабаева А. Г., Лиознер Л. Д., Райцина С. С., Романова Л. К., Рябинина З. А., Сидорова В. Ф. и Харлова Г. В. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960, 9—10.
Астауров Б. Л. Успехи соврем. биол., 1948, **25**, 1, 49—88.
Астауров Б. Л. В кн.: Действие высоких и низких температур на развитие тутового шелкопряда. М., 1958, 5—38.
Астауров Б. Л., Острякова-Варшавер В. П. и Струнников В. А. В кн.: Действие высоких и низких температур на развитие тутового шелкопряда. М., 1958, 39—80.
Баев А. А. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва Д. И. Менделеева, 1963, **8**, 1, 2—11.
Белоусова А. К. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963, **8**, 4, 413—424.
Бляхер Л. Я. В кн.: Физические и химические основы жизненных явлений. М., 1963, 5—58.
Бляхер С. Л., Воронцова М. А. и Райцина С. С. Бюлл. Мос. об-ва испыт. природы, отдел. биол., 1957, 62, 2, 110.
Богомолов К. С., Дебердеев М. Ю., Сиротинская А. А. и Уварова В. М. Труды Всесоюзн. научно-иссл. кинофотоинститута. Вып. 11 (21). М., 1957, 87—93.
Богоявленская Н. В. и Доброхотов В. Н. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1958, 46, 8, 104—108.
Бочков Н. П. Цитология, 1960а, 2, 4, 396—403.
Бочков Н. П. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960б, 13—14.
Бочков Н. П. и Косиченко Л. П. Цитология, 1963, 5, 6, 654—655.
Булгак В. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1965, 59, 1, 90—93.

Бунцер Я. М. Успехи соврем. биол., 1964, 57, 1, 143—158.
Васильев Ю. М. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963, 8, 4, 362—372.
Введенский Н. Е. Полн. собр. соч. Т. 2. Л., 1951.
Вегер Е. М. В кн.: Пробл. регенерации и клеточного деления. М., 1959, 217—220.
Веселкина М. Н. Цитология, 1962, **4**, 5, 571—573.
Виноградова Г. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1960, **50**, 11, 105—108.
Виноградова Г. А. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 28.
Войткевич А. А. В кн.: Соврем. вопр. эндокринологии. М., 1960, 48—93.
Воронина Л. Г. Фармакология и токсикология, 1948, **11**, 6, 17—21.
Вундер П. А. Пробл. эндокринологии и гормонотерапии, 1962, **8**, 1, 117—126.
Генес С. Г. Нервная система и внутренняя секреция. М., 1953.
Генес С. Г. Архив патологии, 1957, **19**, 6, 3—14.
Георгиев Г. П. Успехи соврем. биол., 1964, **57**, 1, 11—29.
Гололобова М. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1958, **46**, 9, 118—122.
Гололобова М. Т. В кн.: Восстановительные процессы у позвоночных животных. М., 1959а, 266—273.
Гололобова М. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959б, **47**, 3, 94—97.
Гололобова М. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, **54**, 9, 96—100.
Грачева Н. Д. Радиобиология, 1964, **4**, 1, 102—107.
Грачева Н. Д., Лыкова Г. С., Фунштейн Л. В. и Щербань Э. И. Пособие по гистоавторадиографии. Л., 1960.
Гриф В. Г. Цитология, 1959, **1**, 2, 229—233.
Гурвич А. и Гурвич Л. Митогенетическое излучение. М., 1945.
Дворкин Г. А. Ж. общ. биол., 1962, **23**, 3, 216—226.
Демина Н. А. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1953, **21**, 1, 41—48.
Демина Н. А. В кн.: Труды ин-та малярии и мед. паразитологии. М., 1959, 28—79.
Денисенко Т. Н. Сб. научн. трудов Рост. н/Д мед. ин-та. Кн. 21, 1963, 173—185.
Детлаф Т. А. Ж. Общ. биол., 1962, **23**, 6, 401—409.
(Детлаф Т. А.) Dettlaff T. A. Exptl Cell Res., 1963, **29**, 3, 490—503.
(Детлаф Т. А.). Dettlaff T. A. Advances in morphogenesis, 1964, 3, 323—362.
Доброхотов В. Н. В кн.: Восстановительные процессы у позвоночных животных. М., 1959а, 95—110.
Доброхотов В. Н. В кн.: Пробл. регенерации и клеточного деления. М., 1959б, 231—238.
Доброхотов В. Н. Вестн. Акад. мед. наук СССР, 1963, № 7, 50—62.
Доброхотов В. Н., Бабаева А. Г. и Курдюмова А. Г. Докл. АН СССР, 1962, **142**, 2, 458—461.
Доброхотов В. Н. и Курдюмова А. Г. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960, 31—32.
Доброхотов В. Н. и Курдюмова А. Г. Докл. АН СССР, 1961, **141**, 1, 208—211.
Доброхотов В. Н. и Курдюмова А. Г. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, **54**, 8, 81—84.
Доброхотов В. Н. и Маркелова И. В. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации клеточного размножения. М., 1960, 30—31.
Доброхотов В. Н. и Никанорова Р. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, 54, 9, 91—96.
Дондуа А. К. и Дондуа Г. К. В кн.: Исследование клеточных циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток. М.— Л., 1964, 5—36.

Дубинин Н. П. и Дубинина Л. Г. Радиобиология, 1963а, **3**, 2, 181—190.
Дубинин Н. П. и Дубинина Л. Г. Радиобиология, 1963б, **3**, 6; 833—846.
Епифанова О. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1956, **42**, 11, 55—57.
Епифанова О. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1958, **46**, 11, 113—117.
Епифанова О. И. В кн.: Пробл. регенерации и клеточного деления. М., 1959а, 257—260.
Епифанова О. И. В кн.: Восстановительные процессы у позвоночных животных. М., 1959б, 199—213.
Епифанова О. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959в, **48**, 9, 120—124.
Епифанова О. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959г, **48**, 12, 96—100.
Епифанова О. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1961а, **51**, 3, 102—105.
Епифанова О. И. В кн.: Вопросы регенерации желез внутренней секреции. М. 1961б, 118—123.
Епифанова О. И. В кн.: Процессы регенерации и клеточного размножения у животных. М., 1961в, 159—172.
Епифанова О. И. Цитология, 1962а, **4**, 2, 128—136. (Epifanova O. I.) Federat. Proc., 1963, **22**, 2 (Part 2), T363—T368.
Епифанова О. И. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962б, 53—54.
Епифанова О. И. Докл. АН СССР, 1963, **149**, 2, 424—427.
Епифанова О. И. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1964, 46, 4, 27—37.
Епифанова О. И., Зосимовская А. И., Ломакина Л. Я., Грушина Н. В. и Смоленская И. Н. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, 55, 1, 96—100.
Епифанова О. И., Курская М. А. и Валеева Н. В. Цитология, 1963, 5, 6, 656—658.
Епифанова О. И. и Смоленская И. Н. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 55.
Епифанова О. И. и Смоленская И. Н. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, 56, 11, 111—115.
Епифанова О. И. и Чумак М. Г. Цитология, 1963, 5, 4, 455—458.
Жинкин Л. Н. В кн.: Радиоактивные индикаторы в гистологии. Л., 1959, 5—33.
Жинкин Л. Н. Докл. АН СССР, 1960, **134**, 3, 694—696.
Жинкин Л. Н. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1962, **42**, 1, 3—21.
Жинкин Л. Н. Предисловие к русскому изданию книги Д. Мэзия Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963, 5—14.
Жинкин Л. Н. и Андреева Л. Ф. Тезисы докл. 2-й научн. конф. ин-та цитологии. Л., 1962, 32—33.
Жинкин Л. Н. и Андреева Л. Ф. Докл. АН СССР, 1953а, **149**, 1, 185—188.
Жинкин Л. Н. и Андреева Л. Ф. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1963б, **44**, 6, 30—39.
Жинкин Л. Н., Заварзин А. А. и Дондуа А. К. Цитология, 1960, **2**, 6, 625—639.
Жинкин Л. Н., Заварзин А. А., Лебедева Г. С. и Андреева Л. Ф. Цитология, 1961, **3**, 4, 478—481.
Журавлева Т. Б. Архив патол., 1964, **26**, 6, 65—72.
Завадовский М. М. Пол и развитие его признаков. М., 1922.
Завадовский М. М. Динамика развития организма. М., 1931.
Завадовский М. М. Противоречивое взаимодействие между органами в теле развивающегося животного. М., 1941.
Залетаева Т. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 10, 93—95.
Залкинд С. Я. Успехи соврем. биол., 1952, **33**, 3, 431—449.
Залкинд С. Я. Успехи соврем. биол., 1954а, **38**, 1 (4), 68—85.
Залкинд С. Я. Докл. АН СССР, 1954б, **99**, 6, 1091—1093.
Залкинд С. Я. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959, **48**, 7, 99—101.

Залкинд С. Я. Цитология, 1961, **3**, 6, 714—718.
Залкинд С. Я. и Уткин И. А. Успехи соврем. биол., 1951, **31**, 2, 231—256.
Зеленин А. В. Успехи соврем. биол., 1962, **53**, 3, 364—374.
Захаров М. К. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1956, **41**, 5, 63—65.
Захаров М. К. Докл. АН СССР, 1958, **123**, 3, 550—553.
Зорин А. Н. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 66—68.
Зосимовская А. И. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1962а, **43**, 11, 99—111.
Зосимовская А. И. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962б, 69—70.
Зосимовская А. И. Докл. АН СССР, 1963, **151**, 3, 687—690.
Зосимовская А. И. Цитология, 1964а, **6**, 1, 98—101.
Зосимовская А. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1964б, **57**, 6, 91—95.
(Зотин А. И.) Zotin A. I. Acta biol. cracoviensia, Ser. Zool., 1962, **5**, 215—228.
Кабак Я. М. Практикум по эндокринологии. М., 1945.
Кафиани К. А. В кн.: Биологические аспекты кибернетики. М., 1962, 210—215.
Кафиани К. А. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963а, **8**, 1, 23—32.
Кафиани К. А. В кн.: Успехи биол. химии. М., 1963б, **5**, 100—150.
Кацнельсон З. С. Цитология, 1959, **1**, 2, 238—252.
Кацнельсон З. С. Клеточная теория в ее историческом развитии. М., 1963.
Киселев Л. Л. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963, **8**, 1, 11—22.
Киселев Л. Л. Успехи соврем. биол., 1964, **58**, 2 (5), 177—200.
Кнорре А. Г. Цитология, 1959, **1**, 5, 494—503.
Козлов В. В. Тезисы докл. 4-й научн. конф. аспирантов и клинич. ординаторов 1-го ЛМИ, 1953, 11—12.
Козлов В. В. Тезисы 5-й научн. конф. аспирантов и клинич. ординаторов 1-го ЛМИ, 1954а, 43—44.
Козлов В. В. Докл. АН СССР, 1954б, **99**, 2, 317—320.
Козлов В. В. Докл. АН СССР, 1955, **105**, 1, 176—179.
Козлов В. В. Докл. АН СССР, 1957, **117**, 6, 1089—1091.
Козлов В. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959а, **47**, 1, 92—97.
Козлов В. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959б, **48**, 9, 114—120.
Коломина С. М. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1964, **58**, 7, 83—86.
Кольцов Н. К. Физико-химические основы морфологии. М.— Л., 1927.
Кольцов Н. К. Организация клетки. М.— Л., 1936.
Косиченко Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1960, **49**, 6, 98—101.
Косиченко Л. П. Докл. АН СССР, 1961а, **138**, 4, 982—984.
Косиченко Л. П. Суточная периодичность митозов и роль светового режима в ее определении. Автореф. дисс. канд. М., 1961б.
Косиченко Л. П. Докл. АН СССР, 1962, **147**, 1, 259—262.
Косиченко Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 1, 114—118.
Коштоянц Х. С. Изв. АН СССР, серия биол., 1961, № 3, 377—385.
Красильникова Н. В. Докл. АН СССР, 1962а, **142**, 5, 1165—1167.
Красильникова Н. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962б, **53**, 4, 100—103.
Красильникова Н. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962в, **54**, 11, 95—98.
Красильникова Н. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963а, **56**, 7, 96—99.
Красильникова Н. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963б, **56**, 8, 93—97.
Лагучев С. С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1958, **46**, 9, 108—112.
Лагучев С. С. В кн.: Пробл. регенерации и клеточного деления. М., 1959а, 250—256.
Лагучев С. С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959б, **48**, 12, 103—108.
Лагучев С. С. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960, 53—54.

Лагучев С. С. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 88—91.
Лагучев С. С. и Будик В. М. Тезисы докл. 2-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1960, 54—55.
Лагучев С. С. и Каргина-Терентьева Р. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 10, 85—88.
Лагучев С. С., Машинская В. Н., Орлова И. И., Залетаева Т. А. и Будик В. М. Цитология, 1962, **4**, 4, 381—390.
Лазарев Н. И. Вестн. Акад. мед. наук СССР, 1961, № 1, 13—26.
Лазарев Н. И. Теоретические основы профилактики и терапии дисгормональных опухолей. М., 1963.
Лазарев Н. И. и Лагова Н. Д. Вестн. Акад. мед. наук СССР, 1963, № 3, 43—49.
Ларионов Л. Ф. Рак и эндокринная система. Л., 1938.
Лейтес С. М. Клинич. медицина, 1934, **12**, 7, 954—968.
Лейтес С. М. Клинич. медицина, 1939, **17**, 4, 26—40.
Лейтес С. М. Успехи соврем. биол., 1945, **19**, 1, 79—97.
Лиознер Л. Д., Артемьева Н. С., Бабаева А. Г., Романова Л. К., Рябинина З. А., Сидорова В. Ф. и Харлова Г. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, **54**, 8, 77—80.
Лиознер Л. Д. и Доброхотов В. Н. Вестн. Акад. мед. наук СССР, 1958, № 11, 41—51.
Лиознер Л. Д. и Сидорова В. Ф. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959, 48, 12. 93—96.
Ломакина Л. Я. Ж. общ. биол., 1963, 24, 6, 393—402.
Лопашов Г. В. и Строева О. Г. Развитие глаза в свете экспериментальных исследований. М., 1963.
Ляпунов А. А. Пробл. кибернетики. Вып. 1. М., 1958, 5—22.
Ляпунов А. А. В кн.: Пробл. кибернетики. Вып. 10. М., 1963, 179—193.
Ляпунов А. А. и Яблонский С. В. В кн.: Пробл. кибернетики. Вып. 9. М., 1963, 5—22.
Малиновский А. А. В кн.: Пробл. кибернетики. Вып. 4. М., 1960, 151—181.
Маркелова И. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, **53**, 6, 74—77.
Мастрюкова В. М. и Стржижовский А. Д. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1964, **58**, 7, 106—109.
Микоша А. С. Влияние эстрона на образование гидрокортизона у морских свинок. Автореф. дисс. канд. М., 1964.
Милицына Н. В. В кн.: Вопросы регенерации желез внутренней секреции. М., 1961, 81—91.
Михайлова Н. В. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1956, **2**, 5, 9—12.
Мицкевич М. С. Железы внутренней секреции в зародышевом развитии птиц и млекопитающих. М., 1957.
Мовчан О. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1961, **52**, 7, 103—106.
Мовчан О. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1964, **57**, 1, 95—98.
Нейман И. М. Основы теоретической онкологии. М., 1961.
Нейман И. М. Патол., физиол. и эксперим. терапия, 1963, **7**, 2, 88—90.
Нейфах А. А. Ж. общ. биол., 1959, **20**, 3, 202—213.
Нейфах А. А. Ж. общ. биол., 1961, **22**, 1, 42—57.
Нейфах А. А. Пробл. взаимоотношений ядра и цитоплазмы в развитии. М., 1962.
Оленов Ю. М. Цитология, 1959, **1**, 5, 527—540.
Отрощенко В. А. и Сахаров В. Н. Докл. АН СССР, 1964, **154**, 6, 1141—1443.
О Чжэн. Докл. АН СССР, 1954, **99**, 6, 1111—1114.
О Чжэн. Реактивные изменения процессов клеточного деления в различных тканях у крыс при действии безусловных и условных раздражителей. Автореф. дисс. канд. Л., 1955.
Павлов И. П. Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей нервной деятельности (поведения) животных. М.—Пг., 1923.

Павлова Е. Б. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1955, **1**, 1, 105—111.
(Перемежко П. И.) Peremeschko P. I. Vorl. Mitt. Centralbl. med. Wiss., 1878, **16**, 30, 547—548.
(Перемежко П. И.) Peremeschko P. I. Arch. mikroscop. Anat. und Entwicklungsgesch., 1879, **16**, 1, 437—457.
Поглазов Б. Ф. Успехи соврем. биол., 1961, **51**, 1, 62—73.
Поупа О. Ж. общ. биол., 1961, **22**, 1, 3—8.
Прилуцкий В. И. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 126—127.
Прокофьева-Бельговская А. А. Ж. общ. биол., 1947, **8**, 4, 247—280.
Прокофьева-Бельговская А. А. и Богданов Ю. Ф. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963, **8**, 1, 33—46.
Пужака Х. Я. Труды ин-та эксперим. и клинич. медицины Акад. наук Латв. ССР, т. 2, 1963, 181—185.
Райцина С. С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1961, **51**, 4, 110—114.
Райцина С. С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 3, 109—113.
Райцина С. С. и Кашинцева В. Н. Докл. АН СССР, 1963, **150**, 4, 949—951.
Рихтер И. Д. Гистофизиологические особенности слизистой оболочки половых путей самок крыс и мышей. (К проблемам физиологической регенерации эпителия и межтканевых корреляций.) Дисс. докт. Курск, 1949.
Романов Ю. А., Прилуцкий В. И., Кремли С. М. и Блохина А. Н. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 134—137.
Романова Л. К. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 139—140.
Рябуха А. К. Докл. АН СССР, 1955, **104**, 4, 642—645.
Рябуха А. К. К вопросу о механизме реактивного торможения клеточного деления. Автореф. дисс. канд. Л., 1956.
Рябуха А. К. Докл. АН СССР, 1958а, **119**, 6, 1121—1124.
Рябуха А. К. Докл. АН СССР, 1958б, **122**, 3, 493—495.
Сахаров В. Н., Отрощенко В. А. и Воронкова Л. Н. Радиобиология, 1965, **5**, 1, 93—96.
Сахаров П. П., Метелкин А. И. и Гудкова Е. И. Лабораторные животные. М., 1952.
Светлов П. Г. В кн.: Вопр. цитологии и общей физиологии. М.— Л., 1960, 263—285.
Светозаров Е. и Штрайх Г. Успехи соврем. биол., 1941, **14**, 1, 1—29.
Семенов Л. Ф., Авджиан М. В., Бочков Н. П. и Топчиян Л. Н. Радиобиология, 1961, **1**, 6, 953—958.
Скебельская Ю. Б. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1956, **2**, 6, 30—37.
Скебельская Ю. Б. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1963, **9**, 1, 111—118.
Скебельская Ю. Б. и Баграмян Э. Р. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1962, **8**, 6, 27—30.
Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
Соболев С. Л. и Ляпунов А. А. Вопр. философии, 1958, № 5, 127—138.
Соколова Л. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1959, **48**, 7, 95—99.
Соколова Л. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1962, **53**, 6, 77—80.
Соколова Л. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1964, **58**, 7, 98—102.
Спирин А. С. Информационн. бюлл. Научн. Совета по пробл. молекулярн. биол. АН СССР, М., 1965.
Спирин А. С. и Белицина Н. В. Успехи соврем. биол., 1965, **59**, 2, 187—204.
Спирин А. С., Белицина Н. В. и Айтхожин М. А. Ж. общ. биол., 1964, **25**, 5, 321—338.

Спирин А. С. и Смирнов В. Н. Изв. АН СССР, серия биол., 1962, № 4, 477—501.
Стрелин Г. С. Вестн. рентгенол., 1935, **15**, 1, 7—16.
Стрелин Г. С. Мед. радиология, 1956, **1**, 1, 27—35.
Стрелин Г. С., Бычковская И. Б. и Козлов В. В. Докл. АН СССР, 1954, **99**, 1, 165—167.
Стрелин Г. С. и Козлов В. В. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., 1959, **36**, 2, 3—21.
Стрелин Г. С. и Суворова Л. В. Докл. АН СССР, 1956, **10**, 3, 483—486.
Суворова Л. В. О реактивном торможении клеточного деления у животных и развитии способностей к нему в онтогенезе. Автореф. дисс. канд. Л., 1955.
Суворова Л. В. Докл. АН СССР, 1956а, **110**, 1, 149—152.
Суворова Л. В. Докл. АН СССР, 1956б, **110**, 2, 293—296.
Телегди Д., Эндреци Е. и Лишак К. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1964, **10**, 1, 103—106.
Терских В. В. Цитология, 1964, **6**, 3, 352—355.
Тимашкевич Т. Б. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 168—169.
Тимашкевич Т. Б. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 1, 100—104.
Тимофеев-Ресовский Н. В. и Ромпе Р. Р. В кн.: Пробл. кибернетики. Вып. 2. М., 1959, 213—227.
Туманишвили Г. Д. Ж. общ. биол., 1964а, **25**, 4, 267—276.
Туманишвили Г. Д. О роли межклеточных взаимодействий в регуляции роста тканей. Автореф. дисс. докт. М., 1964б.
Туманишвили Г. Д. и Табидзе Д. Д. Докл. АН СССР, 1962, **146**, 1, 246—249.
Туманишвили Г. Д. и Табидзе Д. Д. Ж. общ. биол., 1963, **24**, 2, 129—139.
Утевский А. М., Осинская В. О., Бутом М. Л. и Могилевский А. Я. В кн.: Соврем. вопр. физиол. и патол. эндокринных желез, Харьков, 1959, 169—171.
Уткин И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1953а, **36**, 1 (7), 36—40.
Уткин И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1953б, **36**, 11, 52—55.
Уткин И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1953в, **36**, 6 (12), 56—61.
Уткин И. А. Вопр. онкологии, 1955, **1**, 4, 3—11.
Уткин И. А. Экспериментальное изучение некоторых закономерностей деления клеток в организме. Дисс. докт. Сухуми, 1958.
Уткин И. А. В кн.: Пробл. регенерации и клеточного деления. М., 1959, 201—210.
Уткин И. А. (Utkin I. A.) Pathol. et biol., 1961, 9, 5—6, 519—522.
Уткин И. А., Авджиан М. В., Бутнев Ю. П. и Кузнецова Г. Г. Цитология, 1961, 3, 6, 668—673.
Уткин И. А. и Косиченко Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1955, 40, 12, 43—47.
Уткин И. А. и Косиченко Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1956а, 41, 4, 62—66.
Уткин И. А. и Косиченко Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1956б, 41, 6, 65—69.
Уткин И. А. и Косиченко Л. П. Докл. АН СССР, 1960, 134, 1, 191—194.
Уткин И. А., Курская М. А. и Федорчук Н. И. Цитология, 1962, **4**, 1, 27—31.
Уткин И. А. и Мовчан О. Т. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1963, **55**, 1, 110—114.
Филипченко Ю. А. Экспериментальная зоология. М.— Л., 1932.
Филатов Д. П. Сравнительно-морфологическое направление в механике развития, его объект, цели и пути. М.— Л., 1939.
Франкфурт О. С. Докл. АН СССР, 1963, **153**, 4, 930—932.
Франкфурт О. С. Радиоавтографическое изучение действия химиотерапев-

тических препаратов и ионизирующего излучения на опухолевые клетки. Автореф. дисс. канд. М., 1964.
Франкфурт О. С., Липчина Л. П. и Эмануэль Н. М. Докл. АН СССР, 1963, **153**, 3, 699—702.
Хейсин Е. М. Ученые записки Ленинградск. Гос. Университета, серия биол., 1937, **3**, 4, 41—53.
Хесин Р. Б. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1961, **6**, 3, 254—259.
Хесин Р. Б. В кн. Клеточн. дифференцировка и индукционные механизмы. М., 1965 ...
Хрущов Н. Г. Докл. АН СССР, 1963, **151**, 5, 1201—1203.
Цанев Р. Г. и Марков Г. Г. Биохимия клеточного деления. М., 1964а.
(Цанев Р. Г. и Марков Г. Г.) Tsanev R. G. and Markov G. G. Folia histochem. et cytochem., 1964b, **2**, 126—133.
Царева Е. С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1960, **49**, 1, 92—94.
(Чистяков И. Д.) Tschistiakoff I. Matériaux pour servir à l'histoire de la cellule végetale. Nuov. Giorn. bot. Ital., 1874, **10**, 1. Материалы к истории растительной клетки.— В кн.: Русские классики морфологии растений. М.— Пг., 1923, 15—24.
Чумак М. Г. Материалы конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., 1962, 190—191.
Чумак М. Г. Цитология, 1963а, **5**, 1, 22—33.
Чумак М. Г. Докл. АН СССР, 1963б, **149**, 4, 960—962.
Чумак М. Г. Радиобиология, 1963в, **3**, 6, 866—874.
Шапиро И. М., Ротт Н. Н. и Расс И. Т. Ж. общ. биол., 1960, **21**, 4, 289—296.
Шапот В. С. Успехи соврем. биол., 1952, **34**, 2 (5), 244—267.
Шапот В. С. Успехи соврем. биол., 1954, **37**, 3, 255—278.
Шапот В. С. Ж. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1963а, **8**, 4, 373—384.
Шапот В. С. Труды 8-го Международного противоракового конгресса. М.— Л., 1963б, 19—26.
Шевченко И. Т. и Кореневский Л. И. Врачебн. дело, 1961, № 2, 22—28.
Шмальгаузен И. И. Проблемы дарвинизма. М., 1946.
Шмальгаузен И. И. Регуляция формообразования в индивидуальном развитии. М., 1964.
Эмме А. М. Успехи соврем. биол., 1960, **49**, 2, 240—259.
Эмме А. М. Часы живой природы. М., 1962.
Энгельгардт В. А. Вопр. философии, 1960, № 7, 113—123.
Эпова И. Э. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1957, **43**, 2, 80—84.
Эпова И. Э. Труды Хабаровск. мед. ин-та, 1959, **18**, 39—48.
Эскин И. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1941, **11**, 3, 268—270.
Эскин И. А. Гормоны овариального цикла и нервная система. М., 1951.
Эскин И. А. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1955, **1**, 1, 52—59.
Эскин И. А. Успехи соврем. биол., 1956, **42**, 3 (6), 343—355.
Эскин И. А. В кн.: Соврем. вопр. эндокринологии. М., 1960, 169—190.
Эскин И. А. и Видавская Г. М. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1956, **2**, 1, 82—87.
Эскин И. А., Каждан В. И. и Святухина О. В. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1955, **1**, 6, 80—83.
Эскин И. А. и Михайлова Н. В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1958, **46**, 8, 100—104.
Юдаев Н. А. и Микоша А. С. Биохимия, 1963, **28**, 3, 462—466.
Юдаев Н. А., Розен В. Б. и Микоша А. С. Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 1964, **10**, 2, 73—76.
Abeloos M. La régéneration et les problémes de la morphogenèse, Paris, 1932.
Adams J. A., Jaraback J. and Talalay P. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 10, 3069—3073.

Agrell I. Nature, 1954, **173**, 4395, 172.
Agrell I. C. r. Soc. biol., 1955a, **149**, 13, 1322—1327.
Agrell I. Exptl Cell Res., 1955b, **8**, 1, 232—234.
Agrell I. Arkiv zool., 1957, **10**, 4—5, 491—496.
Agrell I. Arkiv zool., 1961, **12**, 5—6, 411—414.
Agrell I. and Persson H. Biochim. et biophys. acta, 1956, **20**, 3, 543—546.
Agrell I. P. S. and Welin-Berger. Nature, 1957, **180**, 4588, 705—706.
Aizawa Y. and Mueller G. C. Federat. Proc., 1960, **19**, 1, 170.
Aizawa Y. and Mueller G. C. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2, 381—386.
Allen E., Smith G. M. and Gardner W. U. Amer. J. Anat., 1937, **61**, 2, 321—341.
Allen J. M. Anat. Rec., 1955, **121**, 2, 252—253.
Allen J. M. Exptl Cell Res., 1956, **10**, 2, 523—532.
Allen J. M. Anat. Rec., 1957, **128**, 3, 515.
Allen J. M. Exptl Cell Res., 1958, **14**, 1, 142—148.
Allison A. C. In: Cell mechanisms in hormone production and action. London, 1961, p. 42—51.
Amoore J. E. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 1961a, **154**, 954, 95—108.
Amoore J. E. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 1961b, **154**, 954, 109—129.
Amoore J. E. J. Cell Biol., 1962a, **13**, 3, 365—371.
Amoore J. E. J. Cell Biol., 1962b, **13**, 3, 373—381.
Amoore J. E. J. Cell Biol., 1963, **18**, 3, 555—567.
Ancill R. J. Biochim. et biophys. acta, 1963, **76**, 1, 135—137.
Anderson E., Bates R. W., Hawthorne E., Haymaker W., Knowlton K., Rioch D. McK., Spence W. T. and Wilson H. Recent Progr. Hormone Res., 1957, **13**, 21—66.
Anderson N. G. Quart. Rev. Biol., 1956, **31**, 3, 169—199.
Anderson N. G., Fisher W. D. and Bond H. E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 486—499.
Annau E., Manginelli A. and Roth A. Cancer Res., 1951, **11**, 5, 304—306.
Antoniades H. N., Daughaday W. H., Slaunwhite W. R., Jr. In: Hormones in human plasma. London, 1960, 455—512.
Arias-Stella J. Arch. Pathol., 1955a, **60**, 1, 49—58.
Arias-Stella J. Arch. Pathol., 1955b, 60, 1, 59—62.
Arpels C., Babcock V. I. and Southam Ch. M. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1964, **115**, 1, 102—106.
Ashby W. R. An introduction to cybernetics. London, 1956. [Русск. перев.: Эшби У. Р. Введение в кибернетику. М., 1959].
Astwood E. B. Amer. J. Physiol., 1939, **126**, 1, 162—170.
Astwood E. B. In: Hormonal regulation of energy metabolism. N. Y., 1957, p. 223—242.
Aurisicchio S., Celano A. and Rinzivillo R. Nuovo cimento, 1960, **18**, Suppl. 2, 179—189.
Bade E. G., Llanos Echave J. M., Naturwissenschaften, 1962, **49**, 15, 351.
Bajer A. Chromosoma, 1961, **12**, 1, 64—71.
Bajer A. et Molè-Bajer J. Colloq. internat. CNRS, 1960, **88**, 209—213.
Barnum C. P., Jardetzky Ch. D. and Halberg F. Amer. J. Physiol., 1958, **195**, 2, 301—310.
Barrett A. M. J. Pharm. and Pharmacol., 1961, **13**, 1, 20—25.
Baserga R. Arch. Pathol., 1963, **75**, 2, 156—161.
Baserga R. and Kisieleski W. E. J. Nat. Cancer Inst., 1962a, **28**, 2, 331—339.
Baserga R. and Kisieleski W. E. Atompraxis, 1962b, **8**, 10, 386—391.
Bass A. D. Annual Rev. Physiol., 1959, **21**, 49—68.
Bassett D. L. Anat. Rec., 1949, **103**, 4, 597—609.
Bělař K. Die cytologische Grundlagen der Vererbung. Berlin, 1928. (Русск. перев.: Белар К. Цитологические основы наследственности. М.— Л., 1934].
Bell L. G. E. J. Theoret. Biol., 1961, **1**, 1, 104—106.

Bell L. G. E. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y.— London, 1963, p. 215—228.
Bender M. A. and Prescott D. M. Exptl Cell Res., 1962, **27**, 2, 221—229.
Bernard C. Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médicine, V. 1—2. Paris, 1855—1856.
Bertalanffy F. D. Cancer Res., 1962, **22**, 5, 627—631.
Bertalanffy F. D. Nature, 1963a, **198**, 4879, 496—497.
Bertalanffy F. D. Naturwissenschaften, 1963b, **30**, 20, 648—649.
Bertalanffy F. D. and Lau Ch. Internat. Rev. Cytol., 1962, **13**, 357—366.
Bertalanffy F. D. and Lau Ch. Acta anat., 1963, **54**, 1—2, 39—81.
Bertalanffy F. D. and McAskill Ch. J. Nat. Cancer Inst., 1964, **32**, 3, 535—545.
Bianchi P. A., Crathorn A. R. and Schooter K. V. Biochim. et biophys. acta, 1962, **61**, 5, 728—735.
Bielschowsky F. Acta Unio internat. contra cancrum, 1961, **17**, 1—2, 121—130.
Biggers J. D. and Claringbold P. J. J. Endocrinol., 1955a, **12**, 1, 1—8.
Biggers J. D. and Claringbold P. J. J. Anat., 1955b, **89**, 1, 124—131.
Biggers J. D., Claringbold P. J. and Hardy M. D. J. Physiol., 1956, **131**, 3, 497—515.
Billen D. Biochim. et biophys. acta, 1962, **55**, 6, 960—968.
Bimes C., Planel H. et David J. F. C. r. Soc. biol., 1959, **153**, 6, 1072—1075.
Bimes C., Planel H. et David J. F. C. r. Soc. biol., 1961, **155**, 1, 138—141.
Bimes C., Planel H., David J. F. et Soleilhavoup J.-P. Bull. Assoc. anat., 1962, N 111, 153—161.
Blumenfeld C. M. Anat. Rec., 1938, **72**, 4, 435—443.
Blumenfeld C. M. Arch. Pathol., 1942, **33**, 6, 770—776.
Blumenfeld C. M. Arch. Pathol., 1943, **35**, 5, 667—673.
Blumenfeld C. M. Arch. Pathol., 1944, **38**, 5, 321—325.
Bollum F. J. and Potter V. R. Cancer Res., 1959, **19**, 5, 561—565.
Bosch L. and Bloemendal H. Biochim. et biophys. acta, 1961, **51**, 3, 613—615.
Boscott R. J. In: The ovary. V. 2. N. Y.— London, 1962, p. 1—45.
Boveri Th. Verhandl. Phys.-med. Gew. Würzburg, 1895, **29**, 1, 1—75.
Boyd G. A. Autoradiography in biology and medicine. N. Y., 1955. [Русск. перев.: Бойд Дж. А. Авторадиография в биологии и медицине. М., 1957].
Brachet J. Biochemical cytology. N. Y., 1957. [Русск. перев.: Браше Ж. Биохимическая цитология. М., 1960].
Bradbury J. T. Endocrinology, 1961, **68**, 1, 115—120.
Braňez E. and Roels H. Nature, 1961, **192**, 4807, 1043—1044.
Brauchhardt G. Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch., 1953, **5**, 5, 373—380.
Braun R., Mittermayer Ch. and Rusch H. P. J. Cell. Biol., 1963, **19**, 2, 9A.
Breuer H. In: Vitamins and hormones. V. 20, N. Y.— London, 1962, p. 285—335.
Broders A. C. and Dublin W. B. Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 1939, **14**, 423—425.
Brody S. Nature, 1958, **182**, 4646, 1386—1387.
Brody S. and Westman A. Acta obstetr. et gynecol. scand., 1960, **39**, 4, 566—574.
Brody S. and Wiqvist N. Endocrinology, 1961, **68**, 6, 971—977.
Brown F. A., Jr. Amer. Scientist, 1959, **47**, 2, 147—168.
Browning H. C., Holmberg L. M. and White W. D. Endocrinology, 1961, **69**, 5, 901—908.

Bucher N. L. R. and Mazia D. J. Biophys. and Biochim. Cytol., 1960, **7**, 4, 651—655.
Buiard F., Brun R. et Jadasson W. Experientia, 1958, **14**, 9, 327—329.
Bullough H. F. J. Endocrinol., 1943, **3**, 3, 280—287.
Bullough H. F. Nature, 1947, **159**, 4029, 101—102.
Bullough W. S. Nature, 1942, **149**, 3775, 271—272.
Bullough W. S. Endocrinol., 1943, **3**, 3, 235—243.
Bullough W. S. Philos. Trans. Roy. Soc. London, B, 1946, **231**, 585, 453—516.
Bullough W. S. Proc. Roy. Soc., B, 1948a, **135**, 879, 212—233.
Bullough W. S. Proc. Roy. Soc., B, 1948b, **135**, 879, 233—242.
Bullough W. S. J. Exptl Biol., 1949, **26**, 3, 287—291.
Bullough W. S. J. Endocrinol., 1950a, **6**, 3, 340—349.
Bullough W. S. J. Endocrinol., 1950b, **6**, 3, 350—361.
Bullough W. S. Vertebrate sexual cycles. N. Y.— London, 1951.
Bullough W. S. J. Endocrinol., 1952a, **8**, 3, 265—274.
Bullough W. S. J. Endocrinol., 1952b, **8**, 4, 365—376.
Bullough W. S. Biol. Revs, 1952c, **27**, 2, 133—168.
Bullough W. S. Ciba Foundat. Colloq. Endocrinol., 1953, **6**, 278—294.
Bullough W. S. Exptl Cell Res., 1955a, **9**, 1, 108—115.
Bullough W. S. In: Vitamins and hormones. V. 13, N. Y.— London, 1955b, p. 261—292.
Bullough W. S. Biol. Revs, 1962a, **37**, 3, 307—342.
Bullough W. S. Nature, 1962b, **193**, 4815, 520—523.
Bullough W. S. Nature, 1963, **199**, 4896, 859—862.
Bullough W. S. and Eisa E. A. J. Exptl Biol., 1950, **27**, 3—4, 257—263.
Bullough W. S. and Green H. N. Nature, 1949, **164**, 4175, 795—796.
Bullough W. S. and Johnson M. Nature, 1951a, **167**, 4247, 488.
Bullough W. S. and Johnson M. Exptl Cell Res., 1951b, **2**, 3, 445—453.
Bullough W. S. and Johnson M. Proc. Roy. Soc. B, 1951c, **138**, 893, 562—575.
Bullough W. S. and Laurence E. B. Exptl Cell Res., 1961a, **24**, 2, 289—297.
Bullough W. S. and Laurence E. B. Proc. Roy. Soc. B, 1961b, **154**, 957, 540—556.
Bullough W. S. and Laurence E. B. Exptl Cell Res., 1964a, **33**, 1—2. 176—194.
Bullough W. S. and Laurence E. B. Sympos. Zool. Soc. London, 1964b, N 12, 1—23.
Bullough W. S. and van Oordt G. J. Acta endocrinol., 1950, 4, 3, 291—305.
Bullough W. S. and Rytömaa T. Nature, 1965, **205**, 4971, 573—578.
Bünning E. Die physiologische Uhr. Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1958.
Burckhard G. Arch. mikroskop. Anat. und Entwicklungsgesch., 1900, **57**, 528—569.
Burkhart E. L. J. Exptl Zool., 1942, **89**, 1, 135—166.
Burrows H. and Horning E. S. Oestrogens and neoplasia. Oxford, 1952.
Buschke W., Friedenwald J. S. and Fleischmann W. Bull. John Hopkins Hospital, 1943, **73**, 3, 143—164.
Bütschli O. Abhandl. Senckenberg. naturforsch. Ges., 1876, **10**, 1—2, 213—464.
Cagianut B. Z. Zellforsch., 1949, **34**, 4, 471—501.
Cagianut B. Schweiz. Z. allgem. Pathol. und Bacteriol., 1958, **21**, 4, 849—858.
Cagianut B. Pathol. et microbiol., 1960, **23**, 4, 439—448.
Cagianut B., Ruch F. und Stäubli W. Z. Zellforsch., 1959, **50**, 1, 28—35.
Callard I.-P. Growth, 1963, **27**, 3, 149—156.
Cameron G. R. Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1955, **6**, 4—6, 293—304.

Cameron I. L. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 12 A.
Cameron I. L. J. Cell Biol., 1964, **20**, 1, 185—188.
Cameron I. L. and Greulich R. C. J. Cell Biol., 1963, **18**, 1, 31—40.
Cameron I. L. and Stone G. E. Exptl Cell Res., 1964, **36**, 3, 510—514.
Canellakis E. S. Annual Rev. Biochem., 1962, **31**, 271—300.
Cannon W. B. Physiol. Revs, 1929, **9**, 3, 399—431.
Carleton A. J. Anat. 1934, **68**, 2, 251—263.
Carter S. B. J. Endocrinol., 1953, **9**, 1, 19—29.
Cater D. B. and Stack-Dunne M. P. J. Endocrinol., 1955, **12**, 1, 174—184.
Cattaneo S. M., Quastler H. and Sherman F. G. Nature, 1961, **190**, 4779. 923—924.
Cavalli G. Arch. ital. anat. e embriol., 1958, **63**, 3, 288—308.
Chantrenne H. The biosynthesis of proteins. Oxford — London — N. Y.— Paris, 1961. [Русск. перев.: Шантрен Ю. Биосинтез белков. М., 1963].
Charollais E., Ponse K. and Jayle M. Ann. endocrinol., 1957, **18**, 1, 109—119.
Chaudhry A. P., Halberg F. and Bittner J. J. J. Appl. Phys., 1956a, **9**, 2, 265—267.
Chaudhry A. P., Halberg F. and Bittner J. J. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1956b, **91**, 4, 603—604.
Chaudhry A. P., Halberg F. and Bittner J. J. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1956c, **16**, 7, 944—945.
Chaudhry A. P., Halberg F. and Bittner J. J. Federat. Proc., 1956d, **15**, 1, 107.
Chèvremont M. Colloq. internat. CNRS, 1960, **88**, 15—21.
Child C. M. Physiological fundations of behavior. N. Y., 1924.
Child C. M. Patterns and problems of development. Chicago, 1941.
Claringbold P. J. J. Endocrinol., 1955, **12**, 2, 93—96.
Claringbold P. J. and Biggers J. D. J. Endocrinol., 1955, **12**, 9—14.
Clark R. H. and Baker B. L. Amer. J. Physiol., 1963, **204**, 6, 1018—1022.
Clever U. Chromosoma, 1961, **12**, 6, 607—675.
Clever U. In: Funktionelle und morphologische Organization der Zelle. Berlin, 1963, S. 30—39.
Clowes F. A. L. J. Exptl Bot., 1961, **12**, 35, 283—293.
Cooper Z. K. J. Invest. Dermatol., 1939, **2**, 5, 289—300.
Cooper Z. K. and Franklin H. C. Anat. Rec., 1940, **78**, 1, 1—8.
Cooper Z. K. and Schiff A. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1938, **39**, 2, 323—324.
Cossa P. La cybernétique. Paris, 1957. [Русск. перев.: Косса П. Кибернетика. М., 1958].
Crandall W. D. Anat. Rec., 1938, **72**, 2, 195—210.
Crathorn A. R. and Shooter K. V. Nature, 1960, **187**, 4737, 614—615.
Crick F. H. C. Nature, 1961, **192**, 4809, 1227—1232.
Crick F. H. C. In: Progress of nucleic acid research, V. 1. N. Y.— London, 1963a, p. 163—217.
(Crick F. H. C.) Крик Ф. Г. К. Биофизика, 1963в, **8**, 5, 529—535.
Cronkite E. P., Bond V. P., Fliedner T. M. and Rubini J. R. Lab. investig., 1959, **8**, 1, 263—277.
Daoust R. and de Lamirande G. In: Canadian Cancer Conference. V. 1. N. Y., 1955, p. 365—373.
Darcis L. Ann. endocrinol., 1962, **23**, 5, 545—555.
Davidson J. N. Boll. Soc. ital. biol. sperim. 1961, **37**, 24 bis, 1327—1349.
Defendi V. and Manson L. A. Pathol. et biol., 1961, **9**, 5—6, 525—528.
Defendi V. and Manson L. A. Nature, 1963, **198**, 4878, 359—361.
De Robertis E. D. P., Nowinski W. W. and Saez F. A. General cytology. Philadelphia — London, 1960. [Русск. перев.: Де Робертис Е., Новинский В. и Саэс Ф. Общая цитология. М., 1962].

Desaive P., Smets W., Dor P., Tagnon H. et Van Rymenant M. Hormones et cancers. Bruxelles, 1958. [Русск. перев.: Дезев П., Сме В., Дор П., Таньон А. и Ван Рименан М. Гормоны и рак. М., 1962].
Deschiens R. et Bénex J. Sang, 1959, **30**, 3, 250—257.
Dewey W. C. and Humphrey R. M. Radiation Res., 1962, **16**, 4, 503—530.
Dewey W. C. and Humphrey R. M. Nature, 1963, **198**, 4885, 1063—1066.
Dewey W. C. and Humphrey R. M. Exptl Cell Res., 1964, **35**, 2, 262—276.
Dewey W. C., Humphrey R. M. and Cork A. Internat. J. Radiation Biol., 1963, **6**, 5, 463—471.
Discherl W. und Breuer H. Z. Krebsforsch., 1953, **59**, 2, 253—260.
Dirscherl W. und Projahn G. Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch., 1962, **12**, 4, 307—310.
Dirscherl W. und Schriefers H. Acta endocrinol., 1961, **36**, 4, 520—526.
Dirscherl W., Zilliken F. und Kropp K. Biochem. Z., 1948, **318**, 4/5, 454—461.
Donnet V., Chevalier J. M., Duflot J. C. et Jacquin M. J. physiol. (France), 1960, **52**, 1, 76—77.
Donnet V., Chevalier J. M. et Prunneyre A. J. Physiol. (France), 1960, **52**, 1, 78—79.
Dorfman R. I. In: The hormones. V. 3. N. Y., 1955, p. 589—664.
Dorfman R. I. In: Mechanism of action of steroid hormones. V. 1. N. Y.—London, 1961, p. 148—156.
Dorfman R. I. Compar. Biochem. and Physiol., 1962, **4**, 2—4, 319—329.
Dörmer R., Tulinius H., Oehlert W. Z. Krebsforsch., 1964, **66**, 1, 11—28.
Dowding E. S. and Weijer J. Nature, 1960, **188**, 4747, 338—339.
Drischel H. In: Regelungsvorgänge in der Biologie. München, 1956, S. 60—75. [Дришель Г. В кн.: Процессы регулирования в биологии, М., 1960, стр. 63—85].
Druckrey H. Archiv exp. Pathol. und Pharmacol., 1938, **188**, 2, 196—207.
Druckrey H., Danneberg P. und Schmähl D. Naturwissenschaften, 1952, **39**, 381—382.
Dubos R. J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1959, **45**, 12, 1687—1696.
Dunn A. Biol. Bull., 1953, **105**, 2, 373.
Duplan J. F. C. r. Soc. biol., 1956, **150**, 10, 1764—1767.
Dziekanowska D., Nowak A. Acta physiol. polon., 1961, **12**, 1, 137—143.
Dziekanowska D., Nowak A. Acta physiol. polon., 1962, **13**, 6, 815—821.
Ebling F. J. J. Endocrinol., 1955, **12**, 1, 38—49.
Eboue-Bonis D., Chambaut A. M., Volfin P. and Clauser H. Nature, 1963, **199**, 4899, 1183—1184.
Edgren R. A. Endocrinology, 1961, **68**, 4, 639—642.
Edgren R. A. and Calhoun D. W. Anat. Rec., 1959, **134**, 3, 558.
Edgren R. A. and Calhoun D. W. Endocrinology, 1961, **68**, 4, 633—638.
Edwards J. L., Koch A. L., Youcis P., Freeze H. L., Laite M. B. and Donalson J. T. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1960, **7**, 2, 273—281.
Ehret C. F. In Biological clocks. V. 25. Cold Spring Harbor.— N. Y., 1960. p. 149—158. [Русск. перев.: Эрет Ч. В кн.: Биологические часы. М., 1964, стр. 247—262].
Elgjo K. Nature, 1963, **200**, 4906, 608.
Elias J. J. and Rivera E. Cancer Res., 1959, **19**, 5, 505—511.
Emge L. A. Obstetr. and Gynecol., 1962, **20**, 6, 915—922.
Emmens C. W. In: Methods in hormone research, V. 2. N. Y.— London, 1962, p. 59—111.
Endröczi E., Lissák K., Tekeres M. Acta physiol. Acad. scient. hung., 1961, **18**, 4, 291—299.

Engel L. L. In: Mechanism of action of steroid hormones. V. 1. Oxford — London — N. Y.— Paris, 1961, p. 1—7.
Engel L. L. and Cameron C. B. In: Hormones in human plasma. London, 1960, p. 399—414.
Engel L. L. and Scott J. F. Recent Progr. Hormone Res., 1960, **16**, 79—96.
Epel D. J. Cell Biol., 1963, **17**, 2, 315—319.
Erichsen S. and Velle W. Acta Endocrinol., 1960, **34**, 1, 27—32.
Erikson R. L. and Szybalski W. Radiation Res., 1963, **18**, 2, 200—212.
Evensen A. Nature, 1962a, **195**, 4842, 718—719.
Evensen A. In: Experimental skin carcinogenesis in mice. Oslo — Bergen, 1962b, p. 93—173.
Evensen A. Bull. Organis. mond. santé, 1963, **28**, 4, 513—515.
Evensen A. and Iversen O. H. Nature, 1962, **196**, 4852, 383—384.
Everett J. J. Endocrinol., 1962, **24**, 4, 491—496.
Everett J. Nature, 1963, **198**, 4883, 896.
Everett J. W. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 497—555.
Farese R. V. and Reddy W. J. Biochim. et biophys. acta, 1963, **76**, 1, 145—148.
Farmer J. N. and Moore A. K. Proc. Iowa Acad. Sci., 1962, **69**, 636—644.
Fautrez J. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y.— London, 1963, p. 199—213.
Feigelson P. and Greengard O. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 12, 3714—3718.
Fergusson D. J. Surgery, 1956, **39**, 1, 30—36.
Firket H. and Verly W. G. Nature, 1958, **181**, 4604, 274—275.
Fitzgerald P. J. In: Analytical cytology. N. Y.— Toronto — London, 1955 (2-е изд.— 1959), 381—429. [Русск. перев.: Фитцджеральд Р. В кн.: Методы цитологического анализа. М., 1957, стр. 294—330].
Flemming W. Schriften Naturwiss. Vereins Schleswig-Holstein, 1878, **3**, 1, 29—52.
Flemming W. Arch. pathol. Anat. und Physiol., 1879, **77**, 1, 1—29.
Flemming W. Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung, Leipzig, 1882.
Flesher J. W., Gupta G. N., Jacobson H. I. and Jensen E. V. Federat. Proc., 1960, **19**, 1, 170.
Forbes T. R. and Hooker C. W. Endocrinology, 1957, **61**, 3, 281—286.
Ford J. K. and Joung R. W. Anat. Rec., 1963, **146**, 2, 125—137.
Franks L. M. Brit. J. Cancer, 1959, **13**, 1, 59—68.
Frei J. V. and Ritchie A. C. J. Nat. Canc. Inst., 1964, **32**, 6, 1213—1220.
Friedenwald J. S. Cancer Res., 1950, **10**, 8, 461—466.
Friedenwald J. S. and Buschke W. Amer. J. Physiol., 1944, **141**, 5, 689—694.
Friedkin M. In: Kinetics of cellular proliferation. N. Y., 1959, p. 97—103.
Friedkin M. and Kornberg A. In: The chemical basis of heredity. Baltimore, 1957, p. 609—614. [Русск. перев.: Фридкин М., Корнберг А. В кн.: Химические основы наследственности. М., 1960, стр. 495—499].
Friedmann E., Marrian D. H. and Simon-Reuss I. Brit. J. Pharmacol., 1948, **3**, 3, 263—270.
Fry R. J. M., Lesher S. and Kohn H. I. Exptl Cell. Res., 1961, **25**, 2, 469—471.
Fuchs U. und Jung V. Z. Krebsforsch., 1960, **63**, 6, 592—598.
Fuchs U., Urbaneck D. und Eisenreich G. Beitr. pathol. Anat. und allgem. Pathol., 1961, **125**, 1, 148—172.
Fujioka M., Koga M. and Lieberman I. J. Biol. Chem., 1963, **238**, 10, 3401—3406.
Furth J. and Kim U. In: Biological approaches to cancer chemotherapy. London — N. Y., 1961, p. 259—276.
Furth J. and Yokoro K. In: Some aspects of internal irradiation. Oxford — London — N. Y.— Paris, 1962, p. 189—205.

Fuxe K. and Nilsson O. Exptl Cell Res., 1963, **32**, 1, 109—117.
Galicich J. H., Halberg F. and French L. A. Nature, 1963, **197**, 4869, 811—813.
Gall J. G. and Callan H. G. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 1962, **48**, 4, 562—570.
Gallagher T. F. In: Chemical specificity in biological interactions. N. Y., 1954, p. 50—64.
Ganong W. F. and Hume D. M. Endocrinology, 1954, **55**, 4, 474—483.
Gardner W. U. Advances Cancer Res., 1953, **1**, 173—232. [Русск. перев.: Гарднер В. В. кн.: Успехи в изучении рака. Т. 1. М., 1955, стр. 122—192].
Gardner W. U. Ciba Foundat. Colloq. Endocrinol., 1958a, **12**, 153—172.
Gardner W. U. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1958b, **71**, 6, 1092—1099.
Garren L. D. and Howell R. R. Federat. Proc., 1963, **22**, 2 (pt 1), 524.
Garren L. D., Howell R. R. and Tomkins G. M. J. Mol. Biol., 1964, **9**, 1, 100—108.
Garren L. D., Howell R. R., Tomkins G. M. and Crocco R. M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1964, **52**, 4, 1121—1129.
Gaulden M. E. and Perry R. P. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1958, **44**, 6, 553—559.
Gautheron D. and Born G. V. R. Biochim. et biophys. acta, 1958, **27**, 3, 580—583.
Gautheron D. and Clauser H. Biochim. et biophys. acta, 1956, **22**, 1, 123—135.
Gautheron D., Clauser H. and Volfin P. Biochim. et biophys. acta, 1957, **24**, 1, 133—136.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1959a, **16**, 3, 527—537.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1959b, **18**, 3, 494—503.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1960a, **19**, 1, 65—72.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1960b, **19**, 1, 72—82.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1960c, **21**, 3, 603—615.
Gelfant S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960d, **90**, 2, 536—549.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1962, **26**, 2, 395—403.
Gelfant S. Internat. Rev. Cytol., 1963a, **14**, 1—39.
Gelfant S. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y., 1963b, p. 229—259.
Gelfant S. Exptl Cell Res., 1963c, **32**, 3, 521—528.
Gelfant S. and Clemmons J. T. J. Cellular and Compar. Physiol., 1955, **46**, 3, 529—540.
Gelfant S., Meyer R. K. and Ris H. J. Exptl Zool., 1955, **128**, 2, 219—258.
German J. L. Trans. N. Y. Acad. Sci., 1962, **24**, 4, 395—407.
German J. L. J. Cell Biol., 1964, **20**, 1, 37—55.
Chadially F. N. and Green H. N. Brit. J. Exptl Pathol., 1957, **38**, 1, 100—110.
Gierer A. J. Mol. Biol., 1963, **6**, 2, 148—157.
Giering J. E. and Zarrow M. X. Acta endocrinol., 1958, **29**, 4, 499—507.
Gilbert C. W., Muldal S., Lajtha L. G. and Rowley J. Nature, 1962, **195**, 4844, 869—873.
Glass R., Loring J., Spencer J. and Villee C. A. Endocrinology, 1961, **68**, 2, 327—333.
Glinos A. D. In: Chemical basis of development. Baltimore, 1958a, p. 813—839.
Glinos A. D. In: Symposium on liver function. Washington, 1958b, p. 425—438.
Glinos A. D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 592—602.
Glinos A. D. and Gey G. O. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1952, **80**, 3, 421—425.
Goldberg I. H. and Rabinowitz M. Science, 1962, **136**, 3513, 315—316.
Goldberg I. H., Rabinowitz M. and Reich E. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 12, 2094—2101.

Goldberg I. H., Rabinowitz M. and Reich E. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **49**, 2, 226—229.
Goldberg I. H., Reich E. and Rabinowitz M. Nature, 1963, **199**, 4888, 44—46.
Goldeck H. und Heinrich W.-D. Acta haematol., 1949, **2**, 3, 167—177.
Goldschmidt R. B. Mechanismus und Physiologie der Geschlechtsbestimmung. Berlin, 1920. [Русск. перев.: Гольдшмидт Р. Механизм и физиология определения пола. М.—П., 1923].
Goldschmidt R. B. Physiologische Theorie der Vererbung. Berlin, 1927.
Goldsmith E. D., Schreiber S. S. and Nigrelli R. F. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1948, **69**, 2, 299—301.
Goldsmith E. D., Schreiber S. S. and Nigrelli R. F. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1949, **71**, 3, 461—463.
Gordon E. E. and Villee C. A. J. Biol. Chem., 1955, **216**, 1, 215—224.
Gorski J. Federat. Proc., 1962, **21**, 2, 212.
Gorski J. and Mueller G. C. Arch. Biochem. and Biophys., 1963, **102**, 1, 21—25.
Gorski J. and Nicolette J. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1963, **103**, 3, 418—423
Green H. N. and Bullough W. S. Brit. J. Exptl Pathol., 1950, **31**, 2, 175—182.
Green H. N. and Ghadially F. N. Brit. Med. J., 1951, **1**, 4705, 496—498.
Green H. N. and Savigear M. Brit. Med. J., 1951, **1**, 4705, 498—500.
Greengard O. and Acs G. Biochim. et biophys. acta, 1962, **61**, 4, 652—653.
Greengard O., Gordon M. and Acs G. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 29A.
Greep R. O. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 240—301.
Greel K. G. Protozoologie. Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1956.
Grönroos M. and Kauppila O. Acta endocrinol., 1959, **32**, 2, 261—271.
Grosjean O., Lemaire R. C. r. Soc. biol., 1962, **156**, 5, 962—965.
Gross P. R. Trans. N. Y. Acad. Sci., 1957, **20**, 2, 154—172.
Gross P. R. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 349—352.
Gross P. R. and Cousineau G. Federat. Proc., 1963a, **22**, 2 (pt 1), 178.
Gross P. R. and Cousineau G. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963b, **10**, 4, 321—326.
Gross P. R. and Cousineau G. H. J. Cell Biol., 1963c, **19**, 1, 260—265.
Gross P. R. and Cousineau G. H. Exptl Cell Res., 1964, **33**, 3, 368—395.
Guttes E. and Guttes S. Federat. Proc. 1962, **21**, 2, 381.
Guttes E. and Guttes S. Experientia, 1963, **19**, 1, 13—15.
Guttes E. and Guttes S. Experientia, 1964, **20**, 5, 269—271.
Gyergyay F. and Hadnagy C. Naturwissenschaften, 1957a, **44**, 13, 781.
Gyergyay F. und Hadnagy C. Acta physiol. Acad. scient. hung., 1957b, **12**, 1—3, 173—182.
Haam von E. and Cappel L. Amer. J. Cancer, 1940, **39**, 3, 351—353.
Hageman R. Kulturpflanze, 1956, **4**, 46—83.
Hagerman D. D. and Villee C. A. J. Biol. Chem., 1957, **229**, 2, 589—597.
Hagerman D. D. and Villee C. A. J. Biol. Chem., 1959, **234**, 8, 2031—2036.
Hagerman D. D. and Villee C. A. In: Mechanism of action of steroid hormones. London — N. Y., 1961, p. 169—187.
Halberg F. Experientia, 1957, **13**, 12, 502—503.
Halberg F. Proc. Roy. Soc. Med., 1963, **56**, 4, 253—260.
Halberg F. H. and Barnum C. P. Amer. J. Physiol., 1961, **201**, 2, 227—230.
Halberg F., Barnum C. P., Silber R. H. and Bittner J. J. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1958, **97**, 4, 897—900.
Halberg F., Bittner J. J. and Cole H. L. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1959, **102**, 3, 650—654.

Halberg F., Bittner J. J. and Smith D. Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung, 1957, **9**, 1—2. 69—73.
Halberg F., Frantz M. J. and Bittner J. J. Anat. Rec., 1957, **129**, 3, 349—356.
Halberg F., Halberg E., Barnum C. P. and Bittner J. J. Photoperiodism and related phenomena in plants. Washington, 1959, p. 830—878.
Halberg F., Halberg E., Wargo D. C. and Visscher M. B. Amer. J. Physiol., 1953, **174**, 2, 313—315.
Halberg F. and Haus E. Amer. J. Physiol., 1960, **199**, 5, 859—862.
Halberg F., Loewenson R., Winter R., Bearman J. and Adkins G. H. Proc. Minnesota Acad. Sci., 1960, **28**, 1, 53—75.
Halberg F., Peterson R. E. and Silber R. H. Endocrinology. 1959, **64**, 2, 222—230.
Halberg F., Zander H. A., Houglum M. W. and Mühlemann H. R. Amer. J. Physiol., 1954, **177**, 3, 361—366.
Halkerston I. D. K., Eichhorn J., Feinstein M., Scully E. and Hechter O. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1960, **103**, 4, 796—799.
Hamburger K. and Zeuthen E. Exptl Cell Res., 1957, **13**, 3, 443—453.
Hamilton T. H. Science, 1962, **138**, 3544, 989.
Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **49**, 3, 373—379.
Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **51**, 1, 83—88.
Hanč O. Hormone. Jena. 1959.
Hancock R. L., Zelis R. F., Schaw M. and Williams-Ashman H. G. Biochim. et biophys. acta, 1962, **55**, 1/2, 257—260.
Handschumacher R. E. and Welch A. D. In: The nucleic acids. V. 3. N. Y.— London, 1960, p. 453—526. [Русск. перев.: Хандшумахер Р. и Велч А. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Т. 3. М., 1962, 372—433].
Hanna C., Bicknell D. S. and O'Brien J. E. Arch. Ophthalmol., 1961, **65**, 5, 693—698.
Hanna C. and O'Brien J. E. Arch. Ophthalmol., 1960, **64**, 4, 536—539.
Hanna C. and O'Brien J. E. Arch. Ophthalmol., 1961, **66**, 1, 103—107.
Harbers E. and Müller W. Biochim. and Biophys. Res. Communs, 1962, **7**, 2, 107—110.
Harde E. C. r. Soc. biol., 1934, **116**, 25, 999—1001.
Harker J. E. J. Exptl Biol., 1956, **23**, 1, 224—234.
Harker J. E. J. Exptl Biol., 1960a, **37**, 1, 164—170.
Harker J. E. In: Biological clocks. V. 25. Cold Spring Harbor — N. Y., 1960b, p. 279—287. [Русск. перев.: Харкер Ж. В кн.: Биологические часы. М., 1964, стр. 460—474].
Harker J. E. The physiology of diurnal Rhythms. Cambridge, 1964.
Harker J. E. Discovery, 1961, **22**, 4, 138—142.
Harkönen M. and Kiviranta A. Ann. med. exp. et biol. Fenniae, 1958, **36**, 3, 213—222.
Harrington H. Biochim. et biophys. acta, 1960, **41**, 3, 461—469.
Harrington H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1961, **95**, 2, 901—910.
Hartl S., Österr. Z. Stomatol., 1956, **53**, 5, 259—268.
Hartmann J. F. J. Cell Biol., 1964, **23**, 2, 363—370.
Haskins A. L. and Leong J. T. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1958, **99**, 3, 750—752.
Hastings J. W. Ann. Rev. Microbiol., 1959, **13**, 297—312.
Hastings J. W. In: Biological clocks. V. 25. Cold Spring Harbor — N. Y. 1960, p. 131—143. [Русск. перев.: Гастингс Дж. В кн.: Биологические часы. М., 1964, 220—239].
Hastings J. W. Proc. 22. Internat. Congr. Physiol. Sci., v. I (pt 1). Amsterdam — London — Milan — N. Y., 1962, p. 37—43.
Hastings J. W., Astrachan L. and Sweeney B. M. J. Gen. Physiol., 1961, **45**, 1, 69—76.

Hastings J. W. and Bode V. C. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, **98**, 4, 876—889.
Hastings J. W. and Sweeney B. Biol. Bull., 1958, **115**, 3, 440—458.
Hastings J. W. and Sweeney B. M. J. Gen. Physiol., 1960, **43**, 4, 697—706.
Healy G. M., Siminovitch L., Parker R. C. and Graham A. F. Biochim. et biophys. acta, 1956, **20**, 2, 425—426.
Hechter O. Cancer Res., 1957, **17**, 5, 512—519.
Hechter O. In: Proc. 1st Internat. Congress of Endocrinology. Copenhagen, 1960, p. 164—170.
Hechter O. In: Mechanism of action of steroid hormones. V. 1. Oxford — London — N. Y.— Paris, 1961, p. 13—19.
Hechter O. and Lester G. Recent Progr. Hormone Res., 1960, **16**, 139—186.
Heilbrunn L. V. In: Abstr. Communs. 19. Internat. Physiol. Congr. Montreal, 1953, p. 448—449.
Heilbrunn L. V. The dynamics of living protoplasm. N. Y., 1956. [Русск. перев.: Гейльбрун Л. Динамика живой протоплазмы, М., 1957].
Heilbrunn L. V., Chaet A. B., Dunn A. and Wilson W. L. Biol. Bull., 1954, **106**, 2, 158—168.
Heilbrunn L. V., Lippman M. M. and Rutman R. J. Federat. Proc., 1955, **14**, 1, 70—71.
Heilbrunn L. V. and Wilson W. L. Biol. Bull., 1956, **110**, 2, 153—156.
Heilbrunn L. V., Wilson W. L. and Lippmann M. Biol. Bull., 1953, **105**, 2, 375.
Heilbrunn L. V., Wilson W. L., Tosteson T. R., Davidson E. and Rutman R. J. Biol. Bull., 1957, **113**, 1, 129—134.
Hell E. Exptl Cell Res., 1963, **32**, 2, 354—357.
Hell E. and Cox D. G. Nature, 1963, **197**, 4864, 287—288.
Hell E. A. and Cruickshank C. N. D. Exptl Cell Res., 1963, **31**, 1, 128—139.
Hemingway J. T. Nature, 1960, **185**, 4706, 106—107.
Hemingway J. T. Nature, 1961, **191**, 4789, 706—707.
Hemingway J. T. and Howard A. N. J. Physiol., 1961, **159**, 2, 58P—59P.
Hendricks S. B. Science, 1963, **141**, 3575, 21—27.
Herranen A. and Mueller G. C. Biochim. et biophys. acta, 1957, **24**, 1, 223—224.
Hertz R. Cancer Res., 1957, **17**, 5, 423—431.
Hess M., Carrigan J. J., Jr. and Hodak J. A. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1961, **106**, 2, 420—422.
Heuson J. C. and Legros N. Cancer, 1963, **16**, 3, 404—407.
Hiatt H. H. and Bojarski T. B. Biophys. and Biochem. Res. Communs, 1960, **2**. 1, 35—39.
Hill A. V. Trans. Farad. Soc., 1930, **26**, 667—678.
Hill A. V. Adventures in biophysics. Philadelphia — London, 1931. [Эпизоды из области биофизики. М.— Л., 1935].
Hinegardner R. and Mazia D. Science, 1962, **136**, 3513, 326.
Hiramoto Y. Exptl Cell Res., 1956, **11**, 3, 630—636.
Hiramoto Y. Exptl Cell Res., 1963a, **32**, 1, 59—75.
Hiramoto Y. Exptl Cell Res., 1963b, **32**, 1, 76—88.
Hisaw F. L. and Hisaw F. L., Jr. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 556—589.
Hoffmann-Berling H. In: Cell, organism and milieu. N. Y., 1959, p. 45—62.
Hofmann F. G. Biochim. et biophys. acta, 1962, **65**, 1, 13—19.
Hogness D. S. In: Biophysical science. A study program. N. Y., 1959, p. 256—268. [Русск. перев.: Хогнесс Д. В кн.: Современные проблемы биофизики. М., 1961, стр. 330—346].

Hökfelt T. and Nilsson O. Exptl Cell Res., 1963, **30**, 3, 608—609.
Holland J. J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 3, 436—443.
Holzbauer M. J. Physiol., 1957, **139**, 2, 306—315.
Hooker C. W. and Pfeiffer C. A. Endocrinology, 1943, **32**, 1, 69—76.
Hornsey S. and Howard A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1956, **63**, 5, 915—928.
Horvath G. Nature, 1963, **200**, 4903, 261.
Hosoya N., Hagerman D. D. and Villee C. A. Biochem. J., 1960, **76**, 2, 297—301.
Hotta Y. and Stern H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963a, **49**, 5, 648—654.
Hotta Y. and Stern H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963b, **49**, 6, 861—865.
Hotta Y. and Stern H. J. Cell Biol., 1963c, **16**, 2, 259—279.
Hotta Y. and Stern H. J. Cell Biol., 1963d, **19**, 1, 45—58.
Howard A. and Pelc S. R. Exptl Cell Res., 1951a, **2**, 2, 178—187.
Howard A. and Pelc S. R. In: Isotopes in biochemistry, L., 1951b, 138—151. [Русск. перев.: Говард А. и Пелк С. В кн.: Изотопы в биохимии. М., 1953, стр. 133—146].
Howard A. and Pelc S. R. Heredity, Suppl., 1953, **6**, 261—273.
Huffman M. H., Jones R. W. and Katzberg A. A. Cancer, 1957, **10**, 4, 707—710.
Huggins Ch., Mainzer K. and Briziarelli G. Recent Progr. Hormone Res., 1958, **14**, 77—87.
Hughes A. The mitotic cycle. London, 1952.
Hughes A. In: The chemical basis of development. Baltimore, 1958, p. 136—156. [Русск. перев.: Хьюз У. В кн.: Современные проблемы биохимии. М., 1961, стр. 344—361].
Hughes W. L., Bond V. P., Cronkite E. P., Brecher G., Painter R. B., Quastler H. and Sherman F. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1958, **44**, 5, 476—483.
Humphrey R. M., Dewey W. C. and Cork A. Radiation Res., 1963, **19**, 2, 247—260.
Hunt T. E. Anat. Rec., 1947, **97**, 3, 344—345.
Hurlock B. and Talalay P. J. Biol. Chem., 1958, **233**, 4, 886—893.
Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M. and Alexander M. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 1962, **48**, 7, 1222—1230.
Isotalo A. and Teir H. Ann. med. exp. of biol. Fenniae, 1953, **31**, 3, 301—304.
Iversen O. H. In: Progress in Experimental Tumor Research. V. 4. Basel — N. Y., 1964, p. 169—206.
Ives D. H., Morse P. A. and Potter V. R. J. Biol. Chem., 1963, **238**, 4, 1467—1474.
Jacob F. and Monod J. J. Mol. Biol., 1961a, **3**, 3, 318—356.
Jacob F. and Monod J. In: Cellular regulatory mechanisms. V. 26, Cold Spring Harbor — N. Y., 1961b, p. 193—211. [Русск. перев.: Жакоб Ф. и Моно Ж. В кн.: Регуляторные механизмы клетки. М., 1964, стр. 278—306].
Jacob F. and Monod J. In: Cytodifferentiation and macromolecular synthesis. N. Y.— London, 1963, p. 30—64.
Jacobson H. I. In: On cancer and hormones. Chicago, 1962, p. 303—320.
Jarabak J., Adams J. A., Williams-Ashman H. G. and Tallalay P. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 2, 345—357.
Jardetzky C. D., Barnum C. P. and Halberg F. Amer. J. physiol., 1956, **187**, 3, 608.
Jensen E. V. Perspect. in Biol. and Med., 1962, **6**, 1, 47—60.
Jensen E, V., Ford E. and Huggins Ch. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 3, 454—459.
Jensen E. V. and Jacobson H. I. In: Recent Progr. Hormone Res., 1962, **18**, 387—414.

Johnson H. A. Cytologia, 1961. **26**, 1, 32—41.
Johnson H. A., and Bond V. P. Cancer, 1961, **14**, 3, 639—643.
Johnson H. A., Rubini J. R., Cronkite E. P. and Bond V. P. Lab. Investig., 1960, **9**, 4, 460—465.
Jolley W. B., Martin W. E., Bamberger J. W. and Stearns L. W. J. Endocrinol., 1962, **25**, 2, 183—188.
Jones R. W., Rhone J. R. ad Huffman M. N. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1960, **104**, 2, 190—191.
Kahlson G. Perspect. in Biol. Med., 1962, **5**, 2, 179—197.
Karakashian M. W. and Hastings J. W. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 12, 2130—2137.
Karakashian M. W. and Hastings J. W. J. Gen. Physiol., 1963, **47**, 1, 1—12.
Karlson P. Perspect. J. Biol. Med., 1963a, **6**, 2, 203—214.
Karlson P. In: Induktion und Morphogenese. Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1963b, S. 101—126.
Karsten G. Z. Bot., 1918, **10**, 1, 1—20.
Kawahara P. S., Wang Shu-Fang and Talalay P. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 5, 1500—1506.
Keir H. M., Binnie B. and Smellie R. M. S. Biochem. J., 1962, **82**, 3, 493—499.
Kidson Ch. and Kirby K. S. Nature, 1964, **203**, 4945, 599—603.
Kiefer G., Kiefer R., Zahn G. und Zahn R. K. Biochem. Z., 1961, **334**, 1, 49—57.
Kihara H. K. and Sibatani A. Biochim. et biophys. acta, 1955, **17**, 4, 579—580.
Kim U. und Furth J. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 1963, **4**, 1, 34.
Kim U., Furth J. and Yannopoulos K. J. Nat. Cancer Inst., 1963, **31**, 2, 233—260.
Kisieleski W. E., Baserga R. and Lisco H. Atompraxis, 1961, **7**, 3, 81—85.
Kit S. and Dubbs D. R. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963, **13**, 6, 500—504.
Kit S., Dubbs D. R. and Piekarski L. J. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963, **11**, 3, 176—182.
Kitay J. I. Nature, 1961, **192**, 4800, 358—359.
Klein H. Arch. pathol. Anat., 1951, **320**, 2, 93—137.
Klein H. und Geisel H. Klin. Wochenschr., 1947, **24/25**, 41—42, 662—663.
Knowlton N. P. and Widner W. R. Cancer Res., 1950, **10**, 1, 59—63.
Knox W. E. and Auerbach V. H. J. Biol. Chem., 1955, **214**, 1, 307—313.
Koburg E. und Maurer W. Biochim. et biophys. acta, 1962, **61**, 2, 229—242.
Koburg E. und Schultze B. Verhandl. Deutsch. Ges. Pathol., 1961, **45**, 103—107.
Kondics L. Ann. Univ. scient. Budapest, Sec. biol., 1962, **5**, 137—147.
Kopriwa B. M. and Leblond C. P. J. Histochem. and Cytochem., 1962, **10**, 3, 269—284.
Kornberg A., Lehman I. R., Bessman M. J. and Simms E. S. Biochim. et biophys. acta, 1956, **21**, 1, 197—198.
Korner A. In: Mechanism of action of insulin. London, 1960, p. 127—149.
Korner A. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963, **13**, 5, 386—389.
Kuchler R. J., Arnold N. J. and Grauer R. C. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1963, **111**, 3, 798—804.
Kuchler R. J. and Grauer R. C. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1962, **110**, 2, 287—292.
Kulenkampff H. Z. Anat. und Entwicklungsgesch., 1961, **122**, 6, 518—533.
Kulenkampff H. Anat. Anz., 1962 (1963), **111**, 230—234.
Kuwada Y. Cytologia, 1963, **28**, 2, 213—224.
Lacassagne A. C. r. Acad. Sci. Paris ,1932, **195**, 15, 630—632.

Lacassagne A. C. r. Soc. biol., 1934, **115**, 9, 937—939.
Lacassagne A. C. r. Soc. biol., 1936, **121**, 7, 607—609.
Laccassagne A. C. r. Soc. biol., 1937, **126**, 25, 193—195.
[Lacassagne A.] Лакассань А. Хирургия, 1957, № 9, 126—128.
Ladman A. J. Anat. Rec., 1954, **120**, 2, 395—407.
Lajtha L. G. In: Nucleic acids. V. 3. N. Y.— London, 1960, p. 527—546. [Русск. перев.: Лайта Л. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Т. 3. М., 1963, стр. 434—450].
Lajtha L. G. J. Cellular and Compar. Physiol., 1963, **62**, 2 (pt. 2), 141—156.
Lajtha L. G., Oliver R. L. and Ellis F. Brit. J. Cancer, 1954, **8**, 2, 367—379.
Lajtha L. G., Oliver R., Kumatori T. and Ellis F. Radiation Res., 1958, **8**, 1, 1—16.
Landau R. L., Ehrlich E. N. and Huggins Ch. J. Amer. Med. Assoc., 1962, **182**, 6, 632—636.
Lane Ch. E. Anat. Rec., 1940, **78**, 1, 31—41.
Lane Ch. E. and Davis F. R. Anat. Rec., 1939, **73**, 4, 429—442.
Lark K. G. Biochim. et biophys. acta, 1960, **45**, 1, 121—132.
Lark K. G. In: Molecular genetics. Pt. 1. N. Y.— London, 1963, p. 153—206. [Русск. перев.: Ларк К. Г. В кн.: Молекулярная генетика. Ч. 1. М., 1964, стр. 168—225].
Lasfargues E. Y. C. r. Soc. biol., 1960, **154**, 10, 1720—1722.
Layde J. P. and Baserga R. Brit. J. Cancer, 1964, **18**, 1, 150—158.
Leathem J. H. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 666—704.
Leblond C. P. and Carriere R. Endocrinology, 1955, **56**, 3, 261—266.
Leblond C. P. and Stevens C. E. Anat. Rec., 1948, **100**, 3, 357—378.
Lehmann F. E. Experientia, 1947, **3**, 6, 223—232.
Lehninger A. L., Walkins Ch. L., Cooper C., Devlin T. M. and Gamble J. L. Science, 1958, **128**, 3322, 450—456.
Leonard S. L. Endocrinology, 1958, **63**, 6, 853—859.
Leonard S. L. Endocrinology, 1962, **71**, 5, 803—809.
Lesher S., Fry R. J. M. and Kohn H. I. Exptl Cell Res., 1961, **24**, 2, 334—343.
Lettré H. Z. Physiol. Chem., 1943a, **278**, 1/6, 201—205.
Lettré H. Z. Physiol. Chem., 1943b, **278**, 1/6, 206—207.
Lettré H. Scientia, 1956, **91**, 4, 127—131.
Lettré H. Forsch. und Fortschritte, 1961a, **35**, 2, 40—44.
Lettré H. In: Biological approaches to cancer chemotherapy. London — N. Y., 1961b, p. 285—293.
Lettré H. Chemotherapia, 1961c, **2**, 3/4, 163—177.
Levine R. In: Survey of Biological Progress. V. 3. N. Y.— London, 1957, p. 185—213.
Leyden van Fortuyn D. C. E. Proc. Sec. Sci. Kongr. Akad. Wet. Amsterdam, 1917, **19**, 1—5, 38—44.
Leyden van Fortuyn D. C. E. Proc. Sec. Sci. Kongr. Akad. Wet. Amsterdam, 1926, **29**, 7, 979—988.
Liao S. and Williams-Ashmann H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 11, 1956—1964.
Llanos Echave J. M. en Bodran A. F. Rev. Soc. argent. biol., 1961, **37**, 7—8, 226—239.
Llanos Echave J. M. and Piezzi R. S. J. Physiol., 1963, **165**, 3, 437—442.
Lloyd C. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1937, **36**, 2, 190—191.
Loeb L. and Haven F. L. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1927, **24**, 9, 898—899.
Loeb L. and Haven F. L. Anat. Rec., 1929, **43**, 1, 1—26.
Long C. N. H. Bull. N. Y. Acad. Med., 1947, **23**, 5, 260—282.

Loran M. R. and Crocker T. T. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 285—291.
Love R. Exptl Cell Res., 1964, **33**, 1—2, 216—231.
Ludford R. J. Arch. exp. Zellforsch., 1936, **18**, 4, 411—441.
Ludwig F. und v. Ries J. Arch. exp. Pathol. und Pharmakol., 1938, **189**, 2, 162—163.
Lüscher M. und Huber W. Rev. suisse zool., 1945, **52**, 1, 349—360.
Lwoff A. et Lwoff M. J. Theoret. Biol., 1962, **2**, 1, 48—62.
Lyons W. R., Li C. H. and Johnson R. E. Recent Progr. Hormone Res., 1958, **14**, 219—254.
Mahnert A. Arch. Gynäkol., 1927. **130**, 275—282.
Mak S. and Till J. E. Radiation Res., 1963, **20**, 4, 600—618.
Malmgren R. A. Cancer Res., 1956, **16**, 3, 232—236.
Maloney M. A., Weber Ch. L. and Patt H. M. Federat. Proc., 1961, **20**, 1 (pt I), 71.
Mandl A. M. Proc. Sec. Sci. Kongr. Akad. Wet. Amsterdam, Ser. C, Biol. and Med. Sci., 1962, **65**, 4, 355—365.
Manson L. A. and Defendi V. Federat. Proc. 1962, **21**, 2, 382.
Marini G. ed Brogi G. Atti Accad. fisiocrit. Stena, Sez. med.-fis., 1960, 8, 2, 923—935.
Martin L. and Claringbold P. J. Nature, 1958, **181**, 4609, 620—621.
Martin L., Cox R. I. and Emmens C. W. J. Endocrinol., 1961, **22**, 2, 129—132.
Martini L. and Morpurgo C. Nature, 1955, **175**, 4469, 1127—1128.
Martini L. and de Poli A. J. Endocrinol., 1956, **13**, 3, 229—234.
Mauer I. Genetics, 1963, **48**, 7, 899—900.
Mazia D. In: Advances in biological and medical physics. N. Y., 1956, p. 69—118. [Русск. перев.: Д. Мэзиа. В кн.: Вопросы биофизики, 1957, М., стр. 136—204].
Mazia D. In: Harvey lectures, V. 53. N. Y., 1959, p. 130—170.
Mazia D. Colloq. internat. CNRS, 1960a, **88**, 167—185.
Mazia D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960b, **90**, 2, 455—469.
Mazia D. In: Tre cell. V. 3. N. Y.— London, 1961a, p. 77—412. [Русск. перев.: Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963].
Mazia D. In: Biological structure and function. V. 2. London — N. Y., 1961b, p. 471—496.
Mazia D. Scient. Amer., 1961c, **205**, 3, 101—120. [Русск. перев.: Мэзия Д. В кн.: Живая клетка. М., 1962, стр. 67—92].
Mazia D. J. Cellular and Compar. Physiol., 1963, **62**, 2 (pt 2), 123—140.
Mazia D. In: Régulateurs naturels de la croissance végétale. Paris, 1964, p. 33—43.
Mazia D., Chaffee R. R. and Iverson R. M. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, **47**, 6, 788—790.
Mazia D., Harris P. J. and Bibring T. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1960, **7**, 1, 1—20.
Mazia D. and Hinegardner R. T. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 1, 148—156.
McCarter J. A. and Quastler H. Biochim. et biophys. acta, 1962a, **55**, 4, 552—553.
McCarter J. A. and Quastler H. Nature, 1962b, **194**, 4831, 873—874.
McCorquodale D. J. and Mueller G. C. J. Biol. Chem., 1958, **232**, 1, 31—42.
McGrath R. A., Leach W. M. and Carlson J. G. Exptl Cell Res., 1965, **37**, 1, 39—44.
McGuire J. and Pesch L. A. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 12, 2157—2163.
McKerns K. W. Endocrinology, 1957, **60**, 1, 130—135.
McKerns K. W. Biochim. et biophys. acta, 1962, **63**, 3, 552—553.
McKerns K. W. Biochim. et biophys. acta, 1963a, **69**, 2, 425—427.

McKerns K. W. Biochim. et biophys. acta, 1963b, **71**, 3, 710—718.
McKerns K. W. Biochim. et biophys. acta, 1963c, **73**, 3, 507—509.
McKerns K. W. and Bell P. H. Recent Progr. Hormone Res., 1960, **16**, 97—119.
McKerns K. W., Coulomb B., Kaleita E. and De Renzo E. C. Endocrinology, 1958, **63**, 6, 709—722.
McMinn R. M. N. J. Anat., 1954, **88**, 4, 527—532.
Mendelsohn M. L. Nat. Cancer Inst., 1960, **25**, 3, 485—500.
Mendelsohn M. L. J Nat. Cancer Inst., 1962, **28**, 5, 1015—1030.
Mendelsohn M. L. In: Cell proliferation. Philadelphia, 1963, p. 190—212.
Mendelsohn M. L., Dohan F. C., Jr. and Moore H. A. J. Nat. Cancer Inst., 1960, **25**, 3, 477—484.
Meng K. und Pohle K. Z. Krebsforsch., 1961, **64**, 3, 219—223.
Merits I. Biochim. and Biophys. Res. Communs, 1963, **10**, 3, 254—259.
Merker P. C., Anido R. and Wooley G. W. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 1959, **3**, 1, 42.
Messier B. and Leblond C. P. Amer. J. Anat., 1960, **106**, 3, 247—285.
Meunier J.-M. C. r. Acad. Sci. Paris, 1959, **248**, 2, 304—307.
Meyer M. Z. Zellforsch., 1954, **40**, 3, 228—256.
Meyer M. Z. Zellforsh., 1958, **47**, 6, 731—759.
Miętkiewski K. Folia morphol., 1959, **10**, 1, 9—27.
Miki T. Exptl Cell Res., 1963, **29**, 1—2, 92—101.
Mizuno I. and Masahito P. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sec. IV, 1961, **9**, 2, 213—222.
Molè-Bajer J. Chromosoma, 1958, **9**, 4, 332—358.
Möllendorff von. W Klin. Wochenschr., 1939a, **18**, 32, 1098—1099.
Möllendorff von W. Z. Zellforsch., 1939b, **29**, 5, 706—749.
Möllendorff von W. Z. Zellforsch., 1943, **32**, 1, 35—82.
Monod J. and Jacob F. In: Cellular regulatory mechanisms. V. 26. Cold Spring Harbor — N. Y., 1961, p. 389—401. [Русск. перев.: Моно Ж. и Жакоб Ф. В кн.: Регуляторные механизмы клетки. М., 1964, стр. 477—497].
Monod J., Changeux J. P. and Jacob F. J. Mol. Biol., 1963, **6**, 4, 306—329. [Русск. перев.: Моно Ж., Шанже Ж., Жакоб Ф. Усп. соврем. биол., 1964, **57**, 3. 370/393].
Montagna W., Kanyon P. and Hamilton J. B. J. Exptl Zool., 1949, **110**, 3, 379—396.
Moore R. J. and Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **52**, 2, 439—446.
Moorhead P. S. and Defendi V. J. Cell Biol., 1963, **16**, 1, 202—209.
Morgan T. H. The physical basis of heredity. N. Y., 1920. [Русск. перев.: Морган Т. Г. Структурные основы наследственности. М.— Л., 1924].
Moya F. J. Exptl Cell Res., 1963, **31**, 3, 457—469.
Mueller G. C. Cancer Res., 1957, **17**, 5, 490—506.
Mueller G. C. In: Biological activities of steroids in relation to cancer. N. Y.— London, 1960, p. 129—145.
Mueller G. C. In: Mechanism of action of steroid hormones. Oxford — London — N. Y.— Paris, 1961, p. 181—187.
Mueller G. C. Exptl Cell Res., 1963, Suppl. 9, 144—149.
Mueller G. C., Gorski J. and Aizawa Y. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, **47**, 2, 164—169.
Mueller G. C., Herranen A. M. and Jervell K. F. Recent Progr. Hormone Res., 1958, **14**, 95—139.
Mueller G. C., Kajiwara R., Stubblefield E. and Rueckert R. R. Cancer Res., 1962, **22**, 9, 1084—1090.
Mühlbock O. Advances of cancer research. 1956, **4**, 371—391. [Русск. перев.: Мюльбок О. В кн.: Успехи в изучении рака. Т. 4. М., 1958, стр. 407—427].

Mühlbock O. In: Biological activities of steroids in relation to cancer. N. Y.— London, 1960, p. 331—342.
Muhlbock O. Helv. med. acta, 1962, **29**, 5—6, 437—444.
Mühlbock O. Neoplasma, 1963, **10**, 4, 337—342.
Mühlemann H. R. and Hartl S. Bull. Schweiz. Acad. med. Wiss., 1955, **11**, 4—5, 379—385.
Mühlemann H. R., Marthaler T. M. and Loustalot P. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1955, **90**, 2, 467—468.
Mühlemann H. R., Marthaler T. M. and Rateitschak K. H. Acta anat., 1956, **28**, 4, 331—341.
Mühlemann H. R., Zander H. A. and Halberg F. J. Dental Res., 1954, **33**, 4, 459—467.
Nallar R. C. r. Soc. biol., 1961a. **155**, 1, 152—154.
Nallar R. C. r. Soc. biol., 1961b, **155**, 1, 174—175.
Naora H. and Naora H. Gann. Japan J. Cancer Res., 1957, **48**, 4, 622—623.
Nathans D. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **51**, 4, 585—592.
Nathanson I. T. and Brues A. M. Endocrinology, 1941, **29**, 3, 327—401.
Naville A. Arch. Biol., 1936, **48**, 1, 1—78.
Nicola A. A., Lantos C. P. and Tramezzani J. H. Experientia, 1962, **18**, 10, 467—468.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1958a, **1**, 4, 375—396.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1958b, **2**, 1, 73—95.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1958c, **2**, 2, 185—199.
Nilsson O. Exptl Cell Res., 1958d, **14**, 2, 434—435.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1959a, **2**, 3, 331—341.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1959b, **2**, 3, 342—351.
Nilsson O. J. Ultrastructure Res., 1959c, **2**, 4, 373—387.
Nilsson O. Exptl Cell Res., 1962a, **26**, 2, 334—343.
Nilsson O. Z. Zellforsch., 1962b, **56**, 6, 803—808.
Nilsson O. and Norberg K.-A. Exptl Cell Res., 1963, **29**, 1—2, 380—388.
Nilsson O. and Wirsén C. Exptl Cell. Res., 1963a, **29**, 1—2, 144—152.
Nilsson O. and Wirsén C. Exptl Cell Res., 1963b, **31**, 3, 470—474.
Noak H. und Schwartze P. Endocrinologie, 1959, **37**, 2/3, 119—133.
Noteboom W. and Gorski J. Federat. Proc., 1963a, **22**, 2 (p 1), 329.
Noteboom W. D. and Gorski J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963b, **50**, 2, 250—255.
Nygaard O. F. In: The effects of ionizing radiations on immune processes, N. Y., 1962, p. 47—73.
Nygaard O. F. and Guttes S. Internat. J. Radiation Biol., 1962, **5**, 1, 33—44.
Nygaard O. F., Guttes S. and Rusch H. P. Biochim. et biophys. acta, 1960, **38**, 2, 298—306.
O'Brien J. S. Cancer Res., 1962, **22**, 3, 267—281.
Odartschenko N., Cottier H., Feinendegen L. E. and Bond V. P. Exptl Cell Res., 1964, **35**, 2, 402—411.
Ohler E. A. and Sevy R. W. Endocrinology, 1956, **59**, 3, 347—355.
Oehlert W. und Büchner Th. Beitr. pathol. Anat. und allgem. Pathol., 1961, **125**, 3, 374—402.
Oehlert W., Kramsch D. und Beck V. Naturwissenschaften, 1963, **50**, 7, 307—308.
Oehlert W., Lauf P. und Seemayer N. Naturwissenschaften, 1962, **49**, 6, 137.
Oppelt W. In: Regelungsvorgänge in der Biologie. München, 1956, 9—15. [Русск. перев.: Оппельт В. В кн.: Процессы регулирования в биологии. М., 1960, стр. 16—26].
Owen M. and Mac Pherson Sh. J. Cell Biol., 1963, **19**, 1, 33—44.
Ozzello L. J. Cell Biol., 1964, **21**, 2, 283—286.
Padilla G. M. and Blum J. J. Exptl Cell Res., 1963, **32**, 2, 289—304.
Padilla M. and Van Dreal P. A. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 54A.
Painter R. B. and Drew R. M. Lab. Investig., 1959, **8**, 1, 278—285.

Painter R. B. and Robertson J. S. Radiation Res., 1959, **11**, 2, 206—217.
Palme G., Liss E. und Wiebel F. Naturwissenschaften, 1964, **51**, 8, 197.
Paschkis K. E. and Rakoff A. E. Recent Progr. Hormone Res., 1950, **5**, 115—142.
Pasteels J. et Lison L. Arch. biol., 1950, **61**, 3, 445—474.
Patt H. M. and Quastler H. Physiol. Revs, 1963, **43**, 3, 357—396.
Pearlman W. H. In: Hormones in human plasma, London, 1960, p. 415—454.
Peckham B., Barash H., Emlen J., Kiekhofer W. and Ladinsky J. Exptl Cell Res., 1963, **30**, 2, 339—343.
Peckham B. and Kiekhofer W. Amer. J. Obstetr. and Gynecol., 1962, **83**, 8, 1021—1026.
Peckham B., Ladinsky J. and Kiekhofer W. Amer. J. Obstetr. and Gynecol., 1963, **87**, 6, 710—716.
Pelc S. R. Biochem. J., 1962, **85**, 3, 642.
Pelc S. R. and Howard A. Radiation Res., 1955, **3**, 2, 135—142.
Peñhos J. C. Acta physiol. latinoamer., 1955, **5**, 1, 22—30.
Peñhos J. C. Acta physiol. latinoamer., 1956, **6**, 3, 95—99.
Peñhos J. C. y Cardeza A. F. Rev. Soc. argent. biol., 1957, 33, 3—4—5, 121—128.
Perlman D., Giuffre N. A., Brindle S. A. and Pan S. C. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1962, **111**, 3, 623—625.
Perrotta C. A. Amer. J. Anat., 1962, **111**, 2, 195—204.
Perrotta C. A., Quastler H. and Staley N. Anat. Rec., 1961, **139**, 2, 263—264.
Perry R. P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 12, 2179—2186.
Perry R. P. Exptl Cell Res., 1963, **29**, 3, 400—406.
Pesch L. A., Piros K. and Klatskin G. Biochim. et biophys. acta, 1962, **62**, 3, 602—603.
Pesch L. A., Piros K. and Moquin R. Federat. Proc., 1963, **22**, 2 (pt 1), 409.
Peter K. Z. Anat. und Entwicklungsgesch., 1925a, **75**, 488—505.
Peter K. Z. Anat. und Entwicklungsgesch., 1925b, **75**, 506—524.
Peter K. Z. Zellforsch., 1940, **30**, 5, 721—750.
Peters J. E., Seipelt H. und Matthies E. Arch. f. Geschwulstforsch., 1964, **23**, 1, 9—14.
Peters R. Z. Naturforsch., 1962, **17b**, 3, 164—168.
Pettersson I. Acta physiol. scand., 1962, **55**, 1, 1—10.
Picón Ortiz J. M. Z. Zellforsch., 1933, **19**, 3, 488—509.
Picón Ortiz J. M. Z. Zellforsch., 1935, **23**, 5, 779—789.
Pilgrim Ch., Erb W. and Maurer W. Nature, 1963, **199**, 4896, 863.
Pilgrim Ch. und Maurer W. Naturwissenschaften, 1962, **49**, 23, 544—545.
Pilgrim Ch. und Maurer W. Exptl Cell Res., 1965, **37**, 1, 183—199.
Pirie A. and Van Heyningen. In: Biochemistry of the eye. Oxford, 1956.
Piroth M. und Khalil K. H. Endocrinologie, 1961, **41**, 1—2, 1—17.
Planel H., David J. F. et Soleilhavoup J. P. C. r. Soc. biol., 1961, **155**, 1, 135—138.
Planel H., David J. F. et Soleilhavoup J. P. C. r. Soc. biol., 1962, **156**, 12, 2142—2145.
Plesner P. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y.— London, 1963, p. 77—91.
Pohle K., Meng K. und Matthies E. Z. Krebsforsch., 1961, **64**, 3, 208—214.
Porter R. W. Recent Progr. Hormone Res., 1954, **10**, 1—27.
Potter V. R. In: The kinetics of cellular proliferation. N. Y., 1959, p. 104—117.
Powell W. F. Biochim. et biophys. acta, 1962a, **55**, 6, 969—978.

Powell W. F. Biochim. et biophys. acta, 1962b, **55**, 6, 979—986.
Preedy J. R. K. In: Methods in hormone research. V. 1. N. Y.— London, 1962, 1—50.
Prescott D. M. Nat. Cancer Inst. Monogr., 1964, **14**, 67—72.
Prescott D. M., Bollum F. J. and Kluss B. C. J. Cell. Biol., 1962, **13**, 1, 172—174.
Prévost [J. L.] et Dumas [J. A.] Ann. sci. natur. Zool. et biol. anim., 1824a, **1**, 1—29.
Prévost et Dumas. Ann. sci. natur. Zool. et biol. anim., 1824b, **2**, 100—121.
Prévost et Dumas. Ann. sci. natur. Zool. et biol. anim., 1824c, **3**, 113—138.
Przibram H. In: Bethe A. u. a. Handbuch der pathologischen und normalen Physiologie. Bd. 14, H. 1. 1926, S. 1080—1113.
Przibram H. Verhandl. 12 Internat. Kongr. Zoologie, Lisboa, 1936, S. 133—143.
Puck T. T. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 57A.
Puck T. T. and Steffen J. Biophys. J., 1963, **3**, 5, 379—397.
Purves H. D. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 161—239.
Quastler H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 580—591.
Quastler H. In: Chemical and biological effects of radiation. N. Y., 1963a. [Цит. по: Patt H. M. and Quastler H., 1963].
Quastler H. Federat. Proc., 1963b, **22**, 6 (p 1), 1330—1333.
Quastler H. In: Cell proliferation. Philadelphia, 1963c, 18—36.
Quastler H. and Sherman F. G. Exptl Cell Res., 1959, **17**, 3, 420—438.
Räsänen T. Growth, 1962, **26**, 1, 1—14.
Räsänen T. Acta physiol. scand., 1963, **58**, 2—3, 201—210.
Räsänen T. and Teir H. Growth, 1961, **25**, 2, 139—149.
Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J. and Tatum E. L. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1962, **48**, 7, 1238—1245.
Reichard P., Canellakis Z. N. and Canellakis E. S. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 9, 2514—2519.
Reinberg A. et Ghata J. Rythmes et cycles biologiques. Paris, 1957.
Rickenbacher T. Z. Zellforsch., 1956, **45**, 3, 339—377.
Riley G. Anat. Rec., 1937, **67**, 3, 327—351.
Rinne U. K. und Kytömäki O. Experientia, 1961, **17**, 11, 512—513.
Ris H. In: Analysis of Development. Philadelphia — London, 1955, p. 91—125
[Ritchie A. C., Frei J. V. and Shinozuka H.] Ритчи А. С., Фрей Дж. В. и Шинозука Х. Тр. 8 Междунар. противоракового конгр., т. 2. М.— Л., 1963, стр. 386—389.
Robbins G. P., Cooper J. A. D. and Alt H. L. Endocrinology. 1955, **56**, 2, 161—166.
Roberts H. S. Quart. Rev. Biol., 1961, **36**, 3, 155—177.
Roberts K. B., Florey H. W. and Joklik W. K. Quart. J. Exptl Physiol., 1952, **37**, 4, 239—257.
Roberts S. and Szego C. M. Physiol. Revs, 1953, **33**, 4, 593—629.
Robinow C. F. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1961, **9**, 4, 879—892.
Robinow C. F. J. Cell Biol., 1963, **17**, 1, 123—152.
Roels H. Exptl Cell Res., 1963, **31**, 2, 407—415.
Roels H. and Lagasse A. Exptl Cell Res., 1961, **23**, 2, 408—409.
Roizman B. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **49**, 2, 165—171.
Rosa Ch. G. and Velardo J. T. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959a, **75**, 2, 491—503.
Rosa Ch. G. and Velardo J. T. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959b, **83**, 2, 122—144.
Rotta H. Planta, 1949, **37**, 3, 399—412.
Rubini J. R., Cronkite E. P., Bond V. P. and Fliedner T. M. J. Clin. Invest., 1960, **39**, 6, 909—918.

Rubini J. R., Keller S. and Eisentraut A. In: Tritium in the physical and biological sciences. V. 2. Vienna, 1962, 247—267.
Rueckert R. R. and Mueller G. C. Cancer Res., 1960, **20**, 11, 1584—1592.
Rusch H. P. and Sachsenmaier W. In: Canadian Cancer Conference, v. 5. N. Y., 1963, p. 167—173.
Saffran M. and Schally A. V. Canad. J. Biochem. and Physiol., 1955, **33**, 3, 408—415.
Sarkar N. K. Nature, 1963, **200**, 4912, 1205—1206.
Sarkar N. K., Mukundun M. A. and Devi A. Nature 1963, **200**, 4912, 1205—1206.
Sawyer C. H. and Everett J. W. Endocrinology, 1959, **65**, 4, 644—651.
Schapiro S., Marmorston J. and Sobel H. Endocrinology, 1958, **62**, 3, 278—282.
Schenk R. Arch. Entwicklungsmech., 1950, **144**, 448—475.
Scheving L. E. Anat. Rec., 1959, **135**, 1, 7—19.
Scheving L. E., Chiakulas J. J. and Abzug H. I. J. Cellular and Compar. Physiol., 1959, **54**, 1, 109—114.
Schleicher W. Cbl. med. Wiss., 1878, **23**, 418—419.
Schleicher W. Arch. mikroscop. Anat., 1879, **16**, 248—300.
Schleiden M. J. Arch. Anat., Physiol. und wiss. Med., 1838, 137—176. [Русск. перев. в приложении к кн.: Шванн Т. Микроскопические исследования. М.— Л., 1939, стр. 409—452].
Schmid W. Die Wirkung von Steroid-Hormonen auf die Zellteilung im Zyclusendometrium und im Corpuscarcinom. Diss. München, 1961.
Schrader F. Mitosis. The movements of chrpmosomes in cell division. N. Y., 1944 and 1953.
Schreiter J. und Meinl G. Z. Pflanzenzücht., 1963, **49**, 1, 81—86.
Schwann Th. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen. Berlin, 1839. [Русск. перев.: Шванн Т. Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений. М.— Л., 1939].
Scott J. F. and Engel L. L. In: Mechanism of action of steroid hormones. London — N. Y., 1961, p. 20—32.
Seed J. Nature, 1963, **198**, 4876, 147—153.
Segal S. Nature, 1964, **203**, 4940, 17—19.
Selye H. Nature, 1936, **138**, 3479, 32.
Selye H. The physiology and pathology of exposure to stress. Montreal, 1950.
Selye H. The story of the adaptation syndrome. Montreal, 1952.
Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме, М., 1960.
Selye H. Stress and the adaptation syndrome. Philadelphia, 1954.
Selye H. Current Res. Anesthesia and Analgesia, 1956, **35**, 3, 182—193.
Selye H. Stress. Stockholm, 1958.
Sentein P. Bull. Assoc. anat., 1962, N 114, 737—749.
Sergi P. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1960, **36**, 11, 526—529.
Shah V. C. Cancer Res., 1963, **23**, 8, 1137—1147.
Sharp G. W. G., Slorach S. A. and Vipond H. J. J. Endocrinol., 1961, **22**, 4, 377—385.
Sherman F. G. and Quastler H. Exptl Cell Res., 1960, **19**, 2, 343—360.
Sherman F. G., Quastler H. and Wimber D. R. Exptl Cell Res., 1961, **25**, 1, 114—119.
Silverman D. A., Liao S. and Williams-Ashman H. G. Nature, 1963, **499**, 4895, 808—809.
Simler M., Schwartz J. and Warter J. C. r. Soc. biol., 1962, **156**, 3, 494—498.
Simmons D. J. Nature, 1964, **202**, 4935, 906—907.
Simpson M. V. Ann. Rev. Biochem., 1962, **31**, 333—368.

Sinha H. P. J. Anat. Soc. India, 1957, **6**, 2, 68—77.
Sisken J. E. and Kinosita R. J. Biophys. and Biochim. Cytol., 1961, **9**, 3, 509—518.
Sisken J. E. and Kinosita R. In: Biological interactions in normal and neoplastic growth. N. Y., 1962, p. 25—35.
Skelton F. R. and Hyde P. M. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1961, **106**, 1, 142—145.
Smelser G. K. Anat. Rec., 1947, **97**, 3, 369—370.
Snell C. C. and Bass A. D. Fderat. Proc., 1960, **19**, 1, 159.
Sobotta J. Arch. mikroskop. Anat. und Entwicklungsgesch., 1895, **45**, 15—93.
Sobotta J. Arch. mikroscop. Anat. und Entwicklungsgesch., 1903, **61**, 274—330.
Sobotta J. Arc. mikroscop. Anat. und Entwicklungsgesch., 1911, **78**, 271—352.
Sollberger A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, **98**, 4, 757—774.
Sollberger A. Biological rhythm research. Amsterdam, 1964.
Soskin S. and Levine R. In: Diseases of metabolism. Philadelphia — London, 1952, p. 15—105.
Søvik O. and Walaas O. Nature, 1964, **202**, 4930, 396—397.
Spaziani E. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1962, **111**, 3, 637—639
Spaziani E. Federat. Proc., 1963a, **22**, 2 (pt 1), 329.
Spaziani E. Endocrinology, 1963b, **72**, 2, 180—191.
Spaziani E. and Szego C. M. Endocrinology, 1958, **63**, 5, 669—678.
Spaziani E. and Szego C. M. Endocrinology, 1959, **64**, 5, 713—723.
St. Amand G. A., Anderson N. G. and Gaulden M. E. Exptl Cell Res., 1960, **20**, 1, 71—76.
Stanners C. P. and Till J. E. Biochim. et biophys. acta, 1960, **37**, 3, 406—419.
Stein K. F. and Allen E. Anat. Rec., 1948, **82**, 1, 1—9.
Steinberg H. and Watson R. H. J. Nature, 1960, **185**, 4713, 615—616.
Stephens G. C. IRE Trans. Med. Electronics, 1959, **6**, 2, 88—92.
Stern H. Ann. Rev. Plant Physiol., 1956, **7**, 91—114.
Stern H. J. Biophys. and biochim. Cytol., 1961, **9**, 2, 271—277.
Stern H. Colloq. internat. Centre nat. rech. scient., 1964, **123**, 19—31.
Stern H. and Hotta Y. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y.— London, 1963a, 57—76.
Stern H. and Hotta Y. In: Meristems and differentiation (Brookhaven Symposia in Biology N 16). Upton, 1963b, p. 59—72.
Stevens E. Anat. Rec., 1948, **100**, 4, 716.
Stevens C. E., Daoust R. and Leblond C. P. Canad. J. Med. Sci., 1953, **31**, 3, 263—278.
Stevens C. E. and Leblond C. P. Anat. Rec., 1953, **115**, 2, 231—245.
Stevens Hooper C. E. Amer. J. Anat., 1961, **108**, 3, 231—244.
Stich H. F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 603—609.
Stone D. Endocrinology, 1962, **71**, 2, 233—237.
Stone D. and Kang Y. S. Endocrinology, 1962, **71**, 2, 238—243.
Stone G. E. J. Cell Biol., 1963, **19**, 2, 68A.
Stone G. E. and Prescott D. M. J. Cell Biol., 1964, **21**, 2, 275—281.
Stone G. M. J. Endocrinol., 1962, **24**, 3, 303—308.
Strasburger E. Über Befruchtung und Zellteilung. Jena, 1875.
Strasburger E. Zellbildung und Zellteilung. Jena, 1880.
Stubblefield E. and Mueller G. C. Cancer Res., 1962, **22**, 9, 1091—1099.
Swann M. M. Quart J. Microscop. Sci., 1953, **94**, 4, 369—379.
Swann M. M. In: Recent development in cell physiology, London, 1954a, p. 185—195.
Swann M. M. Exptl Cell Res., 1954b, **7**, 2, 505—517.
Swann M. M. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, A, 1955, **24**, 1, 5—7.

Swann M. M. Cancer Res., 1957, **17**, 8, 727—757.
Swann M. M. Cancer Res., 1958, **18**, 10, 1118—1160.
Sweeney B. M. In: Biological clocks. V. 25. Cold Spring Harbor — N. Y., 1960, p. 145—148. [Русск. перев.: Суини Б. В кн.: Биологические часы. М., 1964, стр. 240—246].
Sweeney B. M. Ann. Rev. Plant Physiol., 1963, **14**, 411—440.
Sweeney B. M. and Hastings J. W. J. Protozool., 1958, **5**, 3, 217—224.
Sweeney B. M. and Hastings J. W. In: Biological clocks. V. 25. Cold Spring Harbor — N. Y., 1960, p. 87—104. (Русск. перев.: Суини Б. и Гастингс Дж. В кн.: Биологические часы. М., 1964, 153—181].
Sweeney B. M. and Haxo F. T. Science, 1961, **134**, 3487, 1361—1363.
Swift H. H. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1950, **36**, 11, 643—654.
Swift H. H. Internat. Rev. Cytol., 1953, **2**, 1—77.
Sydnor K. L. and Sayers G. Endocrinology. 1954, **55**, 5, 621—636.
Szent-Györgyi A. Bioenergetics. N. Y., 1957. [Русск. перев.: Сент-Дьердьи А. Биоэнергетика. М., 1960].
Takao I. and Moriyama A. J. Biochem., 1963, **53**, 5, 408—415.
Talalay P. Physiol. Revs, 1957, **37**, 3, 362—389.
Talalay P. In: Biological approaches to cancer chemotherapy. London — N. Y., 1961, 59—75.
Talalay P. In: On cancer and hormones. Chicago, 1962, p. 271—289.
Talalay P., Hurlock B. and Williams-Ashman H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1958a, **44**, 9, 862—884.
Talalay P., Hurlock B. and Williams-Ashman H. G. Science, 1958b, **127**, 3305, 1060.
Talalay P. and Williams-Ashman H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1958, **44**, 1, 15—26.
Talalay P. and Williams-Ashman H. G. Recent Progr. Hormone Res., 1960, **16**, 1—47.
Talwar G. P. and Segal S. J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 2, 226—230.
Talwar G. P., Segal S. J., Evans A. and Davidson O. W. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **52**, 4, 1059—1066.
Tamaoki T. and Mueller G. C. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1962, **9**, 5, 451—454.
Tamaoki T. and Mueller G. C. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963, **11**, 404—410.
Tata J. R. Nature, 1963, **197**, 4873, 1167—1168.
Taylor E. W. Federat. Proc., 1961, **20**, 1 (pt 1), 148.
Taylor E. W. J. Cell Biol., 1963a, **19**, 1, 1—18.
Taylor E. W. J. Cell Biol., 1963b, **19**, 2, 70A.
Taylor E. W. J. Cell Biol., 1965, **25**, 1 (pt 2), 145—160.
Taylor J. H. Exptl Cell Res., 1958, **15**, 2, 350—357.
Taylor J. H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960a, **90**, 2, 409—421.
Taylor J. H. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1960b, **7**, 7, 455—464.
Taylor J. H. Internat. Rev. Cytol., 1962, **13**, 39—73.
Taylor J. H. In: Molecular genetics. Pt 1, N. Y.— London, 1963, p. 65—111. [Русск. перев.: Тэйлор Дж. Г. В кн.: Молекулярная генетика. Ч. 1. М., 1964, стр. 78—125].
Taylor J. H., Woods P. S. and Hughes W. L. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1957, **43**, 1, 122—127.
Teir H. and Carpin I. Acta pathol. et microbiol. scand., 1959, **47**, 3, 291—297.
Teir H. and Isotalo A. Ann. med. exp. et biol. Fenniae, 1953, **31**, 2, 171—180.
Teir H. and Isotalo A. Ann. med. exp. et biol. Fenniae, 1954, **32**, 1, 1—4.
Teir H. and Ravanti K. Exptl Cell Res., 1953, **5**, 2, 500—507.
Terasima T. and Tolmach L. J. Nature, 1961, **190**, 4782, 1210—1211.

Terasima T. and Tolmach L. J. Science, 1963a, **140**, 3566, 490—492.
Terasima T. and Tolmach L. J. Biophys. J., 1963b, **3**, 1, 12—33.
Téti M. et Langlois M. C. r. Soc. biol., 1954, **148**, 11—12, 1031—1032.
Thiessen D. D. and Nealey V. G. Endocrinology, 1962, **71**, 2, 267—270.
Tice L. W. Anat. Rec., 1961, **139**, 4, 515—523.
Till J. E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1961, **95**, 2, 911—919.
Timmis G. M. Advances Cancer Res., 1961, **6**, 369—401. [Русск. перев.: Тиммис Дж. В кн.: Успехи в изучении рака. Т. 6. М., 1964, стр. 347—380].
Tislowitz R. Anat. Rec., 1939, **75**, 3, 265—273.
Tomkins G. M. and Maxwell E. S. Annual Rev. Biochem., 1963, **32**, 677—708.
Töndury G. Arch. Entwicklungsmech., 1944, **142**, 1, 1—52.
Töndury G. Acta anat., 1947, **4**, 1—2, 269—275.
Töndury G. und Cagianut B. Biol. Revs, 1951, **26**, 1, 28—58.
Tosteson T. R., Ferguson S. A. and Davidson E. Arch. Pathol., 1959, **68**, 2, 232—242.
Tosteson T. R., Ferguson S. A., Davidson E. and Rutman R. J. J. Nat. Cancer Inst., 1958, 20, 6, 1011—1022.
Troop R. C. and Possanza G. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1962, **98**, 3, 444—449.
Trott J. R. and Gorenstein S. L. Arch. Oral Biol., 1963, **8**, 3, 425—434.
Ts'o P. O. P. and Lu P. Federat. Proc., 1963, **22**, 2 (pt 1), 583.
Ts'o P. O. and Lu P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **51**, 1, 17—23.
Turian G. and Cantino E. C. Cytologia, 1960, **25**, 1, 101—107.
Ueno I. Nagoya J. Med. Sci., 1957a, **20**, 1, 67—74.
Ueno I. Nagoya J. Med. Sci., 1957b, **20**, 1, 75—80.
Ui H. and Mueller G. C. Federat. Proc., 1963a, **22**, 2 (pt 1), 409.
Ui H. and Mueller G. C. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963b, **50**, 2, 256—260.
Umbarger H. E. In: Cellular regulatory mechanisms. V. 26. Cold Spring Harbor — N. Y., 1961, p. 301—311.
Van't Hof J. Cytologia, 1963, **28**, 1, 30—35.
Van't Hof J., Wilson G. B. and Colon A. Chromosoma, 1960, **11**, 3, 313—321.
Varner J. E. and Chandra G. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, **52**, 1, 100—106.
Vasama R. and Vasama R. An. med. exp. et biol. Fenniae, 1957, **35**, 4, 363—370.
Vasama R. and Vasama R. Acta anat., 1958, **33**, 3, 230—237.
Velardo J. T. Amer. J. Physiol.. 1957a, **190**, 3, 408—412.
Velardo J. T. Amer. J. Physiol., 1957b, **191**, 2, 319—322.
Velle W. and Erichsen S. Acta endocrinol., 1960, **33**, 2, 277—286.
Verwoerd-Verhoef H. L. and Verwoerd C .D. A. Nature, 1962, **193**, 4821, 1208.
Villee C. A. J. Biol. Chem., 1955, **215**, 1, 171—182.
Villee C. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959a, **75**, 2, 524—534.
Villee C. A. Perspect. Biol. and Med., 1959b, **2**, 3, 290—308.
Villee C. A. In: Enzymes in health and disease. Illinois, 1960, p. 73—103.
Villee C. A. In: Somatic stability in the newly born. London, 1961, p. 246—278.
Villee C. A. In: The molecular control of cellular activity. N. Y.— Toronto — London, 1962, p. 297—318.
Villee C. A. and Gordon E. E. J. Biol. Chem., 1955, **216**, 1, 203—214.
Villee C. A. and Hagerman D. D. Endocrinology, 1957, **60**, 4, 552—558.
Villee C. A. and Hagerman D. D. J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1, 42—48.
Villee C. A., Hagerman D. D. and Joel P. B. Recent Progr, Hormone Res., 1960, **16**, 49—77.
Villee C. A., Joel P. B., Loring J. M. and Spencer J. M. Federat. Proc., 1960, **19**, 1 (pt 1), 53.

Volm M. Z. vergl. Physiol., 1964, **48**, 2, 157—180.
Voutilainen A. Acta pathol. et microbiol. scand., Suppl., 1953, **99**.
Waldeyer W. Arch. mikroscop. Anat., 1888, **31**, 1, 1—122.
Walker B. E. Anat. Rec., 1959, **133**, 2, 459.
Walker B. E. Amer. J. Anat., 1960, **107**, 2, 95—106.
Walker B. E. Cancer Res., 1963, **23**, 2, 157—164.
Walker P. M. B. J. Exptl Biol., 1954, **31**, 1, 8—15.
Walker P. M. B. and Jates H. B. Proc. Roy Soc., B, 1952, **140**, 890, 274—299.
Walker P. M. B. and Mitchison J. M. Exptl Cell Res., 1957, **13**, 1, 167—170.
Wanka F. Ber. Deutsch. bot. Ges., 1962, **75**, 10, 457—464.
Ward E. W. B. and Ciurysek K. W. Amer. J. Bot., 1962, **49**, 4, 393—399.
Wassermann F. Z. Anat., 1926, **80**, 344—432.
Wassermann F. Arch. exp. Zellforsch., 1939, **22**, 238—251.
[Watson J. D.] Уотсон Д. Д. Биофизика, 1963, **8**, 4, 401—416.
Watson J. D. and Crick F. H. C. Nature, 1953a, **171**, 4356, 737—738.
Watson J. D. and Crick F. H. C. In: Viruses. V. 18. Cold Spring Harbor — N. Y., 1953b, 123—131.
Weaver M. E. Anat. Rec., 1959, **135**, 4, 303—311.
Weill J. D., Busch S., Chambon P. and Mandel P. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1963, **10**, 2, 122—126.
Weiss L. In: Cell mechanisms in hormone production and action. London, 1961, p. 24—33.
Weiss P. Entwicklungsphysiologie der Tiere. Dresden — Leipzig, 1930.
Weiss P. Principles of development. N. Y., 1939.
Weiss P. In: Biophysical science. A study program. N. Y., 1960, p. 11—20. [Русск. перев.: Вейсс П. В кн.: Современные проблемы биофизики. М., 1961, стр. 21—34].
Weiss P. In The molecular control of cellular activity. N. Y.— Toronto — London, 1962, p. 1—72.
Weiss P. In: Canadian Cancer Conference. V. 5. Honey Harbour (Ontario), 1963, p. 241—276.
Weissman S. M.. Smellie R. M. S. and Paul J. Biochim. et biophys. acta, 1960, **45**, 1, 101—110.
Went H. A. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1959a, **5**, 2, 353—356.
Went H. A. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1959b, **6**, 3, 447—455.
Went H. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 422—429.
Went H. A. and Mazia D. Exptl Cell Res., 1959, Suppl. 7, 200—218.
Wessels N. K. J. Cell Biol., 1964, **20**, 3, 415—433.
Whitfield J. F. and Rixon R. H. Exptl Cell Res., 1959, **18**, 1, 126—137.
Whitfield J. F., Rixon R. H. and Youdale T. Exptl Cell Res., 1961, **22**, 450—454.
Whitmore G. F., Stanners C. P., Till J. E. and Gulyas S. Biochim. et biophys. acta, 1961, **47**, 1, 66—77.
Whitten W. K. J. Endocrinol., 1958, **17**, 3, 307—313.
Whitten W. K. J. Endocrinol., 1959, **18**, 1, 102—107.
Widner W. R., Storer J. B. and Lushbaugh C. C. Cancer Res., 1951, **11**, 11, 877—884.
Wiener N. Cybernetics, N. Y., 1948. [Винер Н. Кибернетика. М., 1958].
Wilder J. Klin. Wochenschr., 1931, **10**, 41, 1889—1893.
Willemse C. H. and Paesi F. J. A. Acta endocrinol., 1958, **27**, 1, 59—63.
Williams M. F. Amer. J. Anat., 1948, **83**, 2, 247—307.
Williams-Ashman H. G. In: On cancer and hormones. Chicago, 1962, 325—346.
Williams-Ashman H. G. In: Cellular control mechanisms and cancer. Amsterdam — London — N. Y., 1964, p. 103—123.
Williams-Ashman H. G., Cassman M. and Klavins M. Federat. Proc., 1959, **18**, 1 (pt 1), 352.

Willmer E. N. Biol. Revs, 1961, **36**, 3, 368—398.
Wilson E. B. The cell in development and heredity. V. 1. N. Y., 1925. [Русск. перев.: Вильсон Э. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. Т. 1. М.— Л., 1936].
Wilson E. B. The cell in development and heredity V. 2. N. Y., 1925. [Русск. перев.: Вильсон Э. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. Т. 2. М.— Л., 1940].
Wilson G. B. and Morrison J. H. Cytologia, 1959, **24**, 1, 43—49.
Wilson J. D. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 1, 93—100.
Wilson J. W. Anat. Rec., 1948, **101**, 4, 672—673.
Wimber D. E. Amer. J. Bot., 1960, **47**, 10, 828—834.
Wittekind D. Naturwissenschaften, 1963, **50**, 7, 270—277.
Wolfe E. C. and Ball E. G. J. Biol. Chem., 1957, **224**, 2, 1083—1098.
Wolfsberg M. F. Exptl Cell Res., 1964, **35**, 1, 119—131.
Wolpert L. In: Cell growth and cell division. N. Y., 1963, p. 277—298.
Woodard J., Rasch E. and Hewson S. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1961, **9**, 2, 445—462.
Woo I. G. Biochim. et biophys. acta, 1963, **68**, 1, 28—33.
Woo I. G. and Munro A. J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **50**, 5, 918—923.
Woolley G. W., Harris J. J., Merker Ph. C., Palm J. E. and Teller M. N. In: Biol. activities of steroids in relation to cancer. N. Y.— London, 1960, 307—330.
Xeros N. Nature, 1962, **193**, 4829, 682—683.
Yamada Masa-Atsu and Puck T. T. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, **47**, 8, 1181—1191.
Yamashita K. Nature, 1963, **200**, 4901, 81—82.
Yarmolinsky M. B. and de la Haba G. L. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1959, **45**, 12, 1721—1729.
Young W. C. In: Sex and internal secretion. V. 1. Baltimore, 1961, p. 449—496.
Zander H. A., Waerhang J. and Halberg C. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1954, **14**, 7, 829.
Zeuthen E. In: Biological structure and function. V. 2. N. Y.— London, 1961, p. 537—548.
Zeuthen E. In: Cell growth and cell division. V. 2. N. Y.— London, 1963, p. 1—7.
Zimmerman A. M. Exptl Cell Res., 1960, **20**, 3, 529—547.
Zimmerman A. M. Exptl Cell Res., 1963, **31**, 1, 39—51.
Zimmerman A. M. and Marsland D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **90**, 2, 470—485.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

Глава I.
РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ 6
1. Биологический смысл деления клеток. Митоз и его особенности 6
2. О регулировании в живых системах 15
3. Регуляция деления клеток. Понятие о митотическом режиме организма 24

Глава II.
РЕГУЛЯЦИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА 28
1. Представление о митотическом цикле и его периодах . . . 28
2. Общие закономерности прохождения клетками периодов митотического цикла 30
3. Изменения в митотических циклах при различных воздействиях. Образование блоков 34
4. Критические периоды митотического цикла 37
5. Молекулярный контроль событий митотического цикла . . . 41
6. Общие принципы регуляции жизненного цикла клетки . . . 45

Глава III.
НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА, СВЯЗАННЫЕ С ДЕЙСТВИЕМ ГОРМОНОВ 53
1. Суточная периодичность клеточного размножения 53
2. Митотический режим в условиях адаптационного синдрома . . 66

Глава IV.
ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК 79
1. Общие принципы гормональной регуляции деления клеток в организме 79
2. Представления о путях воздействия гормонов на митоз . . . 81
3. Вопрос о специфичности реакции на гормон. Органы-мишени, ткани-мишени 85

Глава V.
РОЛЬ ЭСТРОГЕНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК 87
1. Особенности действия эстрогенов на деление клеток в различных тканях 87
2. Действие эстрогенов на деление клеток в органах-мишенях . 90
3. Действие эстрогенов на деление клеток в органах, не относящихся к категории органов-мишеней 96
4. Действие эстрогенов на деление клеток в условиях инкубации органов 97
5. Вопрос об антимитотическом действии эстрогенов 100

Глава VI.
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭСТРОГЕНОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ 104
1. Действие эстрогенов на проницаемость клетки 104
2. Взаимодействие эстрогенов с ферментативными системами . 106
3. Действие эстрогенов на генетический аппарат клетки . . . 114
4. Вопрос о множественном характере действия эстрогенов на клетку 122

Глава VII.
ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКОГО РЕЖИМА ТКАНЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ 126
1. Материал и методы исследования 126
2. Митотический режим эпителия матки и эпителия роговицы на протяжении эстрального цикла 130
3. Митотический режим эпителия матки в условиях нарушения эстральных циклов 137
4. Митотический режим эпителия матки на ранних сроках беременности 143
5. Действие эстрогенов на митотическую активность эпителия матки и эпителия роговицы 146
6. Митотический режим эпителия матки в различных условиях введения эстрогенов 149
7. Митотический режим эпителия матки при введении эстрогенов в сочетании с некоторыми метаболитами и стимуляторами деления клеток 157
8. Действие эстрогенов на продолжительность митоза и интеркинеза в эпителии матки и эпителии роговицы 163
9. Действие эстрогенов на деление клеток в эпителии матки и эпителии роговицы в условиях инкубации 169

Глава VIII.
ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ И КИНЕТИКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРОГЕНОВ 173
1. Материал и методы исследования 173
2. Действие эстрогенов на митотический цикл и кинетику клеточной популяции эпителия матки 180
3. Действие эстрогенов на митотический цикл эпителия роговицы 190
4. Радиоавтографический анализ тормозящего действия повторных инъекций эстрогена на митотический цикл эпителия матки . 193
5. Особенности реакции на эстроген ткани-мишени и неспецифической ткани 198

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 202

ЛИТЕРАТУРА 210

Ольга Игоревна Епифанова

Гормоны и размножение клеток

Утверждено к печати
Институтом молекулярной биологии Академии наук СССР

Редактор *Г. М. Игнатьева*
Редактор издательства *Е. А. Колпакова*
Технический редактор *Н. П. Кузнецова*

Сдано в набор 18/V 1965 г. Подписано к печати 19/VIII 1965 г.
Формат 60×90 1/16. Печ. л. 15 1/4+2 вкл. (0,1 печ. л.)
Уч.-изд. л. 16,5+2 вкл. (0,1 уч.-изд. л.) Тираж 5000 экз. Т-11083.
Изд. № 3756/65. Тип. зак. № 5703. Темплан 1965 г. № 635

Цена 1 р. 29 к.

Издательство «Наука», Москва, К-62, Подсосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука».
Москва, К-62, Подсосенский пер., 21

1 р. 29 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

О. И. ЕПИФАНОВА • ГОРМОНЫ И РАЗМНОЖЕНИЕ КЛЕТОК

Человек

Wir Frauen
wählen Liste
2
National-
Sozialisten

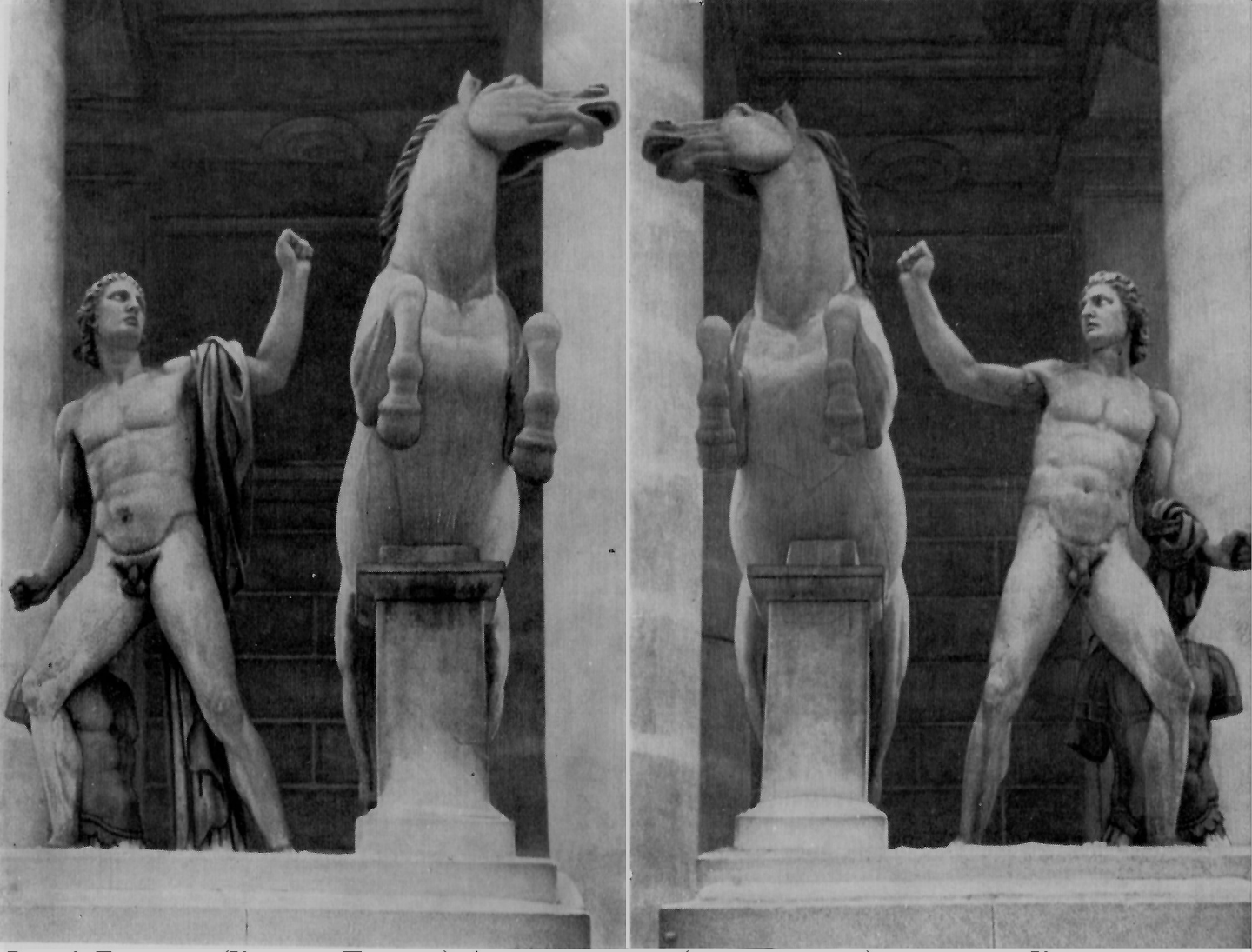


Рис. 6. Диоскуры (Кастор и Поллукс). Античные статуи (симметричные) на площади Квиринала в Риме. Копии в Ленинграде.

Napoli - Museo Nazionale - Ces
Prof. J. Götz. „Weibliche Figur"
Museo Vaticano. Venere Gou

PIC•COLLAGE

Рис. 3. Разнояйцевые близнецы разного пола — РБр (Донара и Рид Богд.).

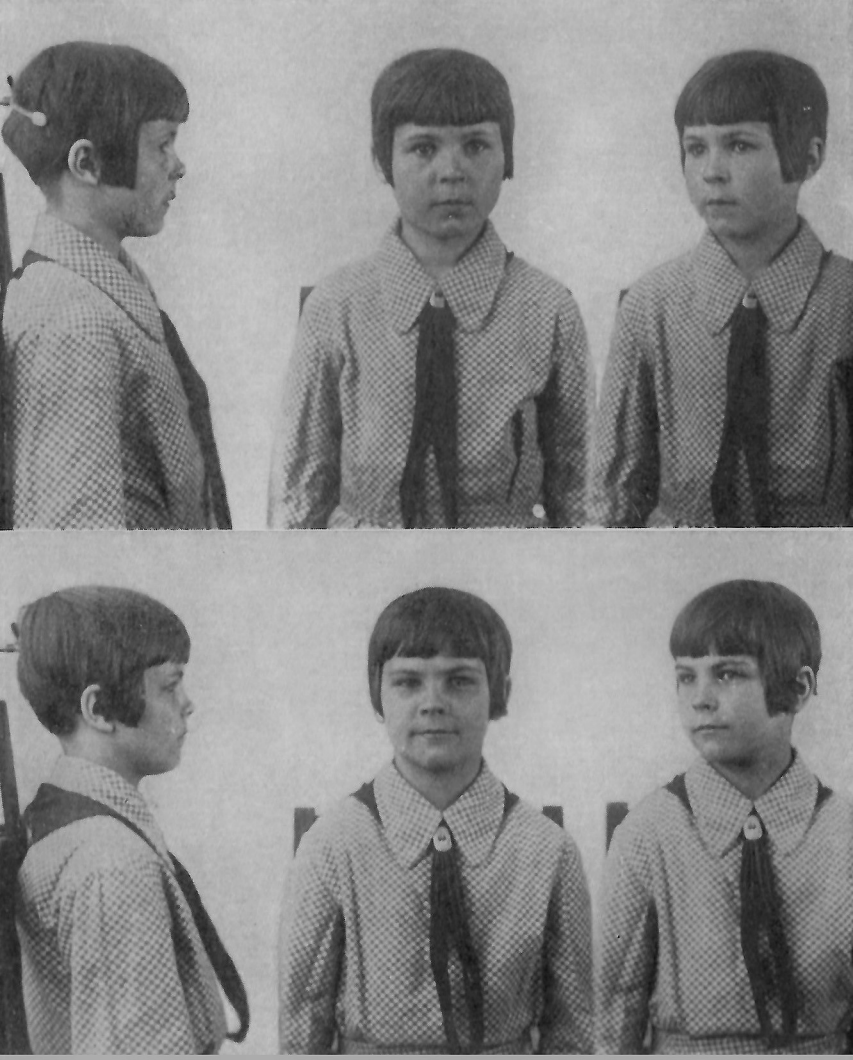


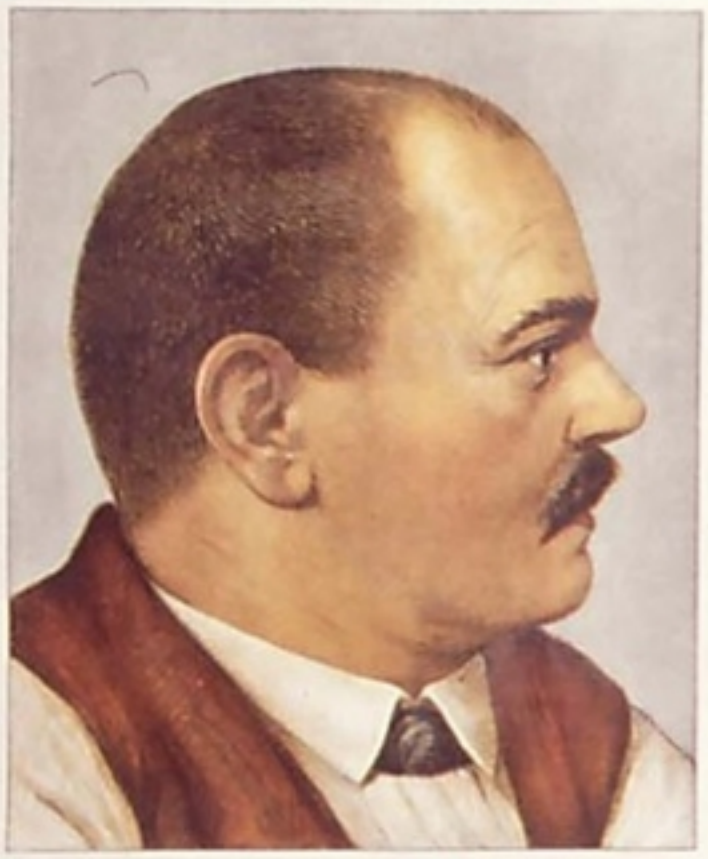
Рис. 2. Разнояйцевые близнецы одного пола — РБо (Минна и Элла Маз.).

Bilder deutscher Rassen 2

Formen: Kleinwüchsig, gedrungen; rundköpfig, breitgesichtig; Nase recht breit; Haar straff.

Farben: Hell, Haar aschblond, Augen weißlich-grau, Haut olivgrau.

Ostbaltische Rasse



Formen: Kleinwüchsig, gedrungen; rundköpfig, rundgesichtig; Nase ziemlich breit; Haar straff.

Farben: Dunkel, Haar dunkelbraun, Augen dunkelbraun, Haut gelblich-braun.

Ostische Rasse

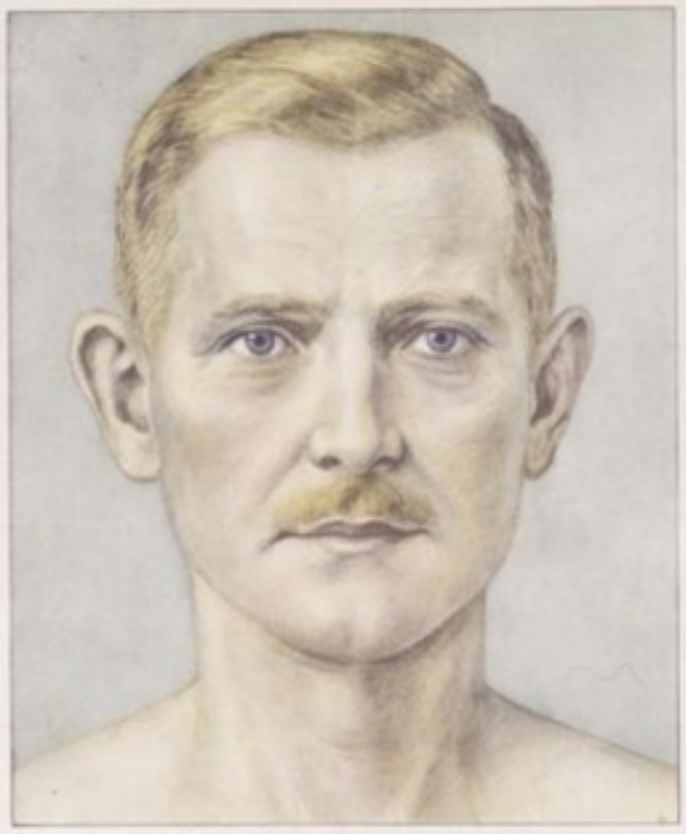
Formen: Sehr großwüchsig, derb-schlank; kurzköpfig, breit-langgesichtig; Nase stark vorspringend, derb; Haar lockig.

Farben: Dunkel, Haar schwarzbraun, Augen schwarzbraun, Haut bräunlich.

Dinarische Rasse

Bilder deutscher Rassen 1

Formen: Großwüchsig, schlank; langköpfig, schmalgesichtig; Nase schmal; Haar wellig.



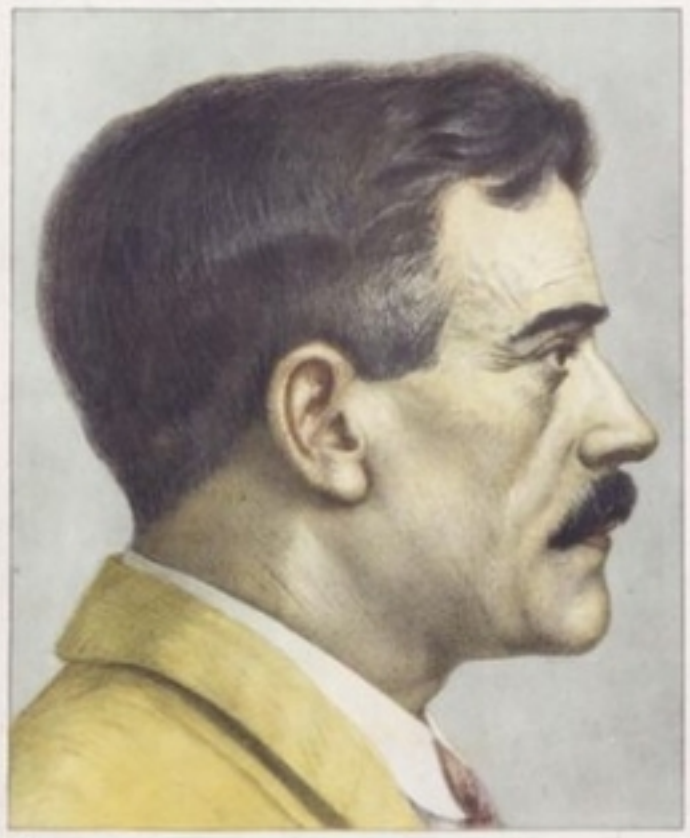
Farben: Sehr hell, Haar goldblond, Augen blau bis grau, Haut rosig-weiß.

Nordische Rasse

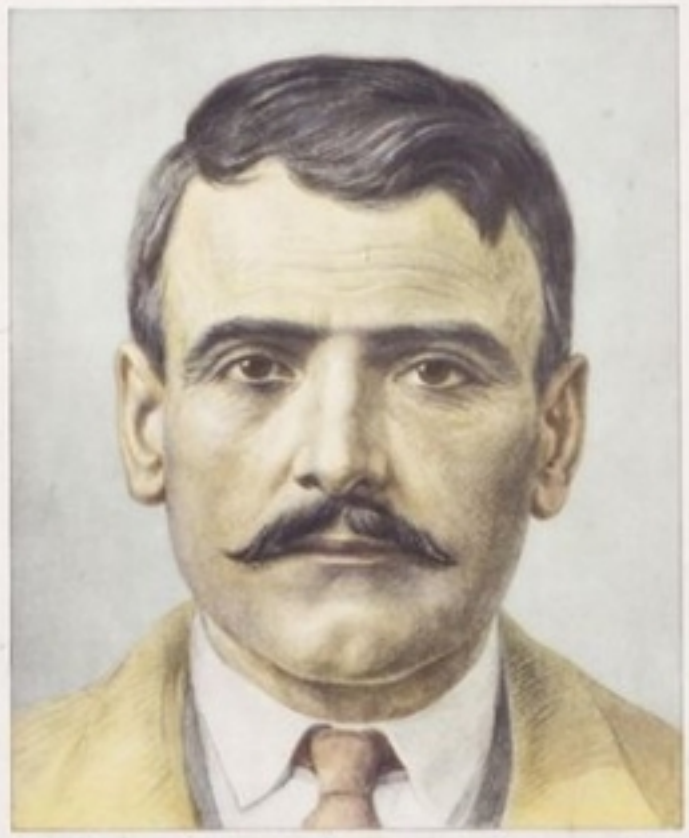
Formen: Sehr großwüchsig, wuchtig; langköpfig, breitgesichtig; Nase ziemlich schmal; Haar wellig oder lockig.

Farben: Hell, Haar blond, Augen blau bis grau, Haut rosig-weiß.

Fälische Rasse



Formen: Kleinwüchsig, schlank; langköpfig, mittelbreitgesichtig; Nase ziemlich schmal; Haar wellig oder lockig.



Farben: Sehr dunkel, Haar schwarz, Augen schwarz, Haut hellbraun.

Westische Rasse

Rassen der Erde I

Europa und seine Grenzgebiete

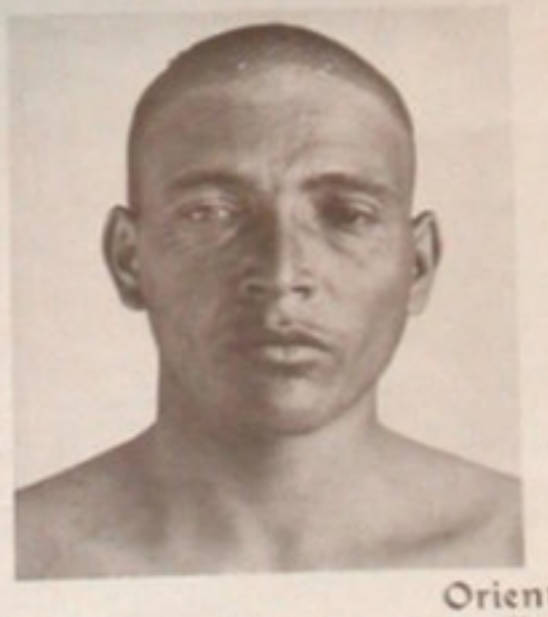
Nordisch
(Niederdeutscher)

Fälisch
(Westfale)

Ostisch
(Litauer)

Ostbaltisch
(Esthe)

Mittelländisch (Westisch)
(Süddeutscher, Salzburger)



Orientalisch
(Araber)

Dinarisch
(Albaner)

Vorderasiatisch
(Armenier)

J. Reibe, herausgegeben von Dr. Bruno K. Schultz, München

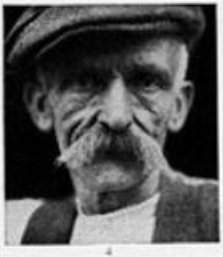
J. F. Lehmanns Verlag, München

J. Reibe, Tafel I.

1

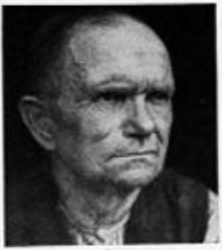
2

3


4

5

6


7

8

9

10

11

12

Einheimische Rassen: 1 Nordischer Mann. 2 Nordische Frau. 3 Fälischer Mann. 4 Dinarischer Mann. 5 Dinarische Frau. 6 Mediterraner Mann. 7 Alpiner Mann. 8 Alpine Frau. 9 Ostbaltischer Mann.
Fremdrassen: 10 Jude. 11 Jüdin. 12 Lappin.

Abb. 1, 3 u. 4 aus Baelinge, die weitere Aufnahmeanordnung des deutschen Reichs; 5 aus D. A. Bünig, Deutsche Rassenkunde; 11 u. 12 aus Fürst E. A. Gurlitt, Rassenkunde des deutschen Reichs.

Nordisch

Südisch

Westisch

Dinarisch

Ostisch

Ostbaltisch

Rassetypen aus Deutschland.

(Nach Aufnahmen von Clara Behnke-Berlin und Anna Lenhart-Dürkopp-Berlin.)

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

1–5 Europide: 1 Georgier. 2 Osmane. 3 Araber. 4 Nordinder: Sikh. 5 Alt-Arier: Pamir-Tadschik. Negride: 6 Dravida: Tamil. 7–13 Mongolide: 7 Chinese. 8 Japaner. 9 Palaung. 10 Siamesin. 11 Giljake. 12 Mongole (Kuldschagebiet). 13 Tschuktsche. 14–16 Urtümliche Rassen: 14 Ainu. 15 Weddafrau. 16 Negrito: Semang.

Zu 1 und Südasien, Kulturstaaten und Kulturgeschichte der Menschheit; 4 und Indien, Die Ausbreitung der Religionen; 10 und Südostasien, Die ethnologischen Gruppen von Ostasien.

Rassen der Menschheit IV. Amerika, Indonesien, Ozeanien

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

Amerika: 1–8 Mongolide: 1 Delaware-Indianer (Nordamerika). 2 Crow-Indianer (Nordamerika). 3 Apache (Nordamerika). 4 Eskimo. 5 Mexikanischer Indianer von San Juan Teotihuacan. 6 Piro-Indianer (Südamerika). 7 Canella-Indianer (Südamerika). 8 Feuerländer: Alakaluf. **Indonesien und Ozeanien:** 9 Indonesier: Bugi (Insulaiaie). 10 Indonesier: Toradja (Alfuraiaie). 11 Polynesier: Mann aus Samoa. 12 Mikronesier: Mann von Mokemok bei Nap. 13 Melanesier: Kworatz-Mann. **14–16 Urtümliche Rassen:** 14 Pygmäe aus Holländisch-Neuguinea. 15 Australier: Südaustralier vom Murray-River. 16 Tasmanierin.

Nach [illegible], Verlauf einer Anthropologie der Insel Sachal; 11 Photo Prof. Dr. August Aichner, Hamburg-Radio-Gesellschaft 1929/30.

Rassen der Menschheit II. Afrika

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

1–3 Europider: 1 Tripolitaner. 2 Äthiopier: Somali. 3 Berber aus Mogador. 4 u. 5 Europid-negride Mischformen: 4 Nilote: Nuer-Mann. 5 Haussa. 6–9 Negride: 6 Sudan-Neger: Bamum. 7 Neger Westafrikas: Mädchen aus Togo. 8 Bantu-Neger: Betschuane vom Barolong-Stamm. 9 Bantu-Neger: Betschuanin vom Barolong-Stamm. 10–12 Urtümliche Rassen: 10 Hottentotte. 11 Buschmann. 12 Pygmäe: Mann der Babinga-Bambuti.

Abb. 1 und Bernatzik, Zwischen Wüsten Nil und Kongo; 8 u. 9 und E. Schultze, Das Bamenland und Kolobori; 10 und Schweitzer, Bambuti, Die Zwerge am Kongo.